

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Redes neuronales para el análisis y control de calidad del  
aceite de oliva virgen extra**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Regina Aroca Santos**

**Director**

**José Santiago Torrecilla Velasco**

**Madrid**  
**Ed. electrónica 2019**

# TESIS DOCTORAL

## Redes Neuronales Para El Análisis Y Control De Calidad Del Aceite De Oliva Virgen Extra



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Autor: Regina Aroca Santos

Director: Prof. Dr. José S. Torrecilla Velasco

Madrid, 2018



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi director y tutor de tesis José Santiago Torrecilla y a Gemma Matute. A Santi, por haberme abierto las puertas de su grupo de investigación y ofrecido la oportunidad de cumplir uno de mis tantos sueños, que es, de momento, del que más orgullosa me siento. A Gemma, el cemento de nuestra pequeña pero, gracias a ella, fuerte estructura, por su ayuda y consejo tanto en los buenos momentos como en los difíciles. Y, a ambos, por enseñarnos a todos a trabajar sin descanso para conseguir nuestras metas, siendo ellos, los primeros en dar el ejemplo desde el primer día con su constante trabajo.

Muchas gracias también a todos mis compañeros, ahora amigos, de Algoreach por acompañarme en esta experiencia y por todas las risas que hemos compartido. A Johnny por su apoyo y amistad durante tantos años incluso ahora que está lejos y también a Miguel y Manuel por todas las mañanas y tardes de preparar, medir y limpiar pero siempre con unos cuantos chistes de por medio.

Me gustaría agradecer a toda mi familia y amigos que han estado conmigo en todo el trayecto de esta Tesis Doctoral.

Gracias a mi madre, padre y hermano por su cariño y apoyo incondicional. A mis padres Ángeles y Alberto, por enseñarme a luchar por mis sueños y a que con ganas y una buena actitud, todo es posible. También por creer siempre en mí y por ayudarme a ver el lado bueno de las cosas, hasta en los malos momentos.

Gracias a Luis, mi amigo y compañero de vida, por ser tan paciente conmigo y nunca dejarme tirar la toalla.

Esta tesis os la dedico a todos vosotros y en especial, a mi abuelita Olga a quien le faltó un suspiro para poder verme conseguir este gran triunfo, pero sé que allí donde esté, me apoyará, como siempre lo hizo.

Os quiero.



# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
RESUMEN .....	9
SUMMARY .....	13
1. INTRODUCCIÓN .....	17
1.1. Composición del aceite de oliva virgen extra .....	19
1.1.1. Fracción saponificable .....	19
1.1.2. Fracción insaponificable .....	21
1.2. Producción del aceite de oliva virgen extra .....	22
1.2.1. Operaciones preliminares .....	23
1.2.2. Preparación de la pasta.....	25
1.2.2.1. Molienda .....	25
1.2.2.2. Batido .....	26
1.2.3. Extracción sólido-líquido.....	27
1.2.3.1. Filtración selectiva.....	27
1.2.3.2. Extracción por presión .....	27
1.2.3.3. Extracción por centrifugación de pasta .....	29
1.2.4. Extracción líquido-líquido .....	31
1.2.4.1. Decantación .....	31
1.2.4.2. Centrifugación.....	31
1.2.5. Almacenamiento del aceite .....	32
1.3. Clasificación de aceites de oliva .....	33
1.4. Fraude alimentario.....	35
1.5. Análisis espectrofotométrico y su tratamiento matemático.....	37
1.5.1. Clasificación .....	38
1.5.2. Tipos de espectros.....	39
1.5.2.1. Espectros de absorción.....	39
1.5.2.2. Espectros de emisión.....	40
1.5.2.3. Espectros Raman .....	41
1.5.3. Ley de Lambert-Beer .....	41
1.5.4. Espectrofotometría ultravioleta y visible .....	43

1.5.5. Redes Neuronales Artificiales .....	43
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
2.1. Aceites utilizados .....	47
2.2. Espectrofotometría UV-visible .....	48
2.3. Redes neuronales artificiales .....	52
2.3.1. Entrenamiento general de la red neuronal .....	53
2.3.2. Optimización del perceptrón multicapa .....	55
2.3.3. Validación del perceptrón multicapa .....	57
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>61</b>
3.1. Espectrofotometría UV-vis en la detección de adulterantes en el AOVE .....	61
3.2. Aplicación del perceptrón multicapa.....	64
3.3. Espectrofotometría UV-vis combinada con redes neuronales para el análisis del aceite de oliva virgen extra .....	66
3.3.1. Detección de la adulteración del AOVE con aceite de oliva refinado .....	66
3.3.2. Detección de la adulteración del AOVE en mezclas binarias y ternarias .....	70
3.3.3. Clasificación de los AOVE monovarietales.....	75
3.3.4. Degradación del AOVE en función de las condiciones de su entorno .....	80
3.3.4.1. Degradación del AOVE en función de la temperatura y el tiempo de almacenamiento .....	81
3.3.4.2. Fotodegradación del AOVE.....	84
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>89</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>93</b>







## RESUMEN

## Redes Neuronales Para el Análisis y Control de Calidad del Aceite de Oliva Virgen Extra

El aceite de oliva virgen extra (AOVE) es el zumo extraído del fruto (aceituna) del olivo (*Olea europea L.*), obtenido exclusivamente mediante procedimientos mecánicos sin el uso de agentes químicos. Para ser clasificado como AOVE, el aceite, entre otras características recogidas en la legislación vigente, debe tener una acidez libre inferior al 1% y ausencia de defectos sensoriales; requisitos mencionados debido a la fragilidad de este aceite vegetal, cuya composición se puede ver afectada por muchas variables relacionadas o no con el mismo proceso de producción, por lo que es sustancial que sea tratado cuidadosamente para que su calidad nutricional y organoléptica no se vea mermada.

Este extraordinario producto representa un papel muy importante dentro de la dieta mediterránea y es también conocido como “oro líquido” gracias a esto y a sus propiedades beneficiosas para la salud, que le hacen diferente a otros aceites de semillas. Todos estos atributos, su delicada elaboración y el hecho de que es un producto de vital importancia para la economía de los principales países productores, como España, hacen que este tipo de aceite tenga un valor elevado en el mercado y, por tanto, cualquier actividad fraudulenta como el etiquetado falso y la adulteración con aceites de menor calidad, vienen siendo problemáticas sobre las que el sector olivícola y la administración deben ofrecer una respuesta fiable para el consumidor.

Las merecidas razones para preservar tanto la reputación como la calidad de los AOVes han dado lugar a un gran número de proyectos de investigación con el fin de entender los procesos y las condiciones que más afectan a las propiedades de este alimento funcional y también para desarrollar tecnologías de detección de adulterantes, para saber cómo obtener el mejor zumo de la aceituna y también para proteger los derechos de los consumidores y al mismo sector oleícola. Es necesario mantener el AOVE en las mejores condiciones posibles de calidad desde que es producido hasta que es consumido. Es por ello por lo que en este trabajo se pretende contrastar la potencialidad de la inteligencia artificial para el control de calidad de este zumo tan preciado.

## RESUMEN

En esta Tesis Doctoral se utiliza la espectrofotometría para el control de calidad de los AOVEs. En concreto, se trabaja con la absorción UV-vis para evaluar y caracterizar los compuestos químicos (fundamentalmente pigmentos como clorofilas y carotenos) presentes en los AOVEs analizados. Estos compuestos pertenecen en su mayoría a la fracción insaponificable.

Los espectros de absorción adquiridos contienen una gran cantidad de información, por lo que es necesario un adecuado tratamiento de los datos para la obtención de resultados satisfactorios. Los modelos clásicos lineales son los más utilizados, pero durante este trabajo se hace uso de las redes neuronales artificiales basadas en algoritmos no lineales y se comprueba que ofrecen mejores resultados en cuanto a rendimiento estadístico y aplicabilidad de la herramienta que los modelos lineales tradicionales.

La característica más importante de las redes neuronales aplicadas es que son herramientas matemáticas de cálculo potentes con la habilidad de encontrar relaciones no lineales entre las variables independientes, que son los datos ofrecidos al modelo, y las variables dependientes, que son la respuesta o información que se intenta alcanzar. Asimismo, estas herramientas son capaces de realizar interpolaciones de forma habitualmente más precisa que otras herramientas clásicas.

El objetivo de esta tesis doctoral es demostrar la hipótesis de que las redes neuronales supervisadas no lineales, basadas en el perceptrón multicapa, son perfectamente capaces de convertir los datos adquiridos mediante técnicas analíticas rápidas, sencillas, no destructivas y de bajo coste, como la espectrofotometría UV-vis, en información útil con márgenes de error bajos, para ayudar en el control de calidad de los AOVEs.

La hipótesis se verificó mediante una serie de experimentos con distintas muestras de aceites, que se dividieron en tres bloques: la detección de adulterantes, la clasificación de AOVEs monovarietales y la degradación de los AOVEs bajo distintas condiciones. El primer bloque consta de dos apartados, uno basado en la adulteración de cuatro AOVE con aceite de oliva refinado y el otro en las mezclas binarias y ternarias de AOVE, aceite de soja y aceite de almendra, para comprobar si los modelos diseñados para el análisis de los datos obtenidos mediante espectrofotometría UV-vis, eran capaces de detectar y cuantificar los adulterantes. En vista de los satisfactorios resultados, en el segundo bloque se aumentó la complejidad para

intentar distinguir y cuantificar mezclas binarias y ternarias de distintos AOVEs monovarietales, con la grata noticia de que los modelos diseñados pudieron cumplir con su cometido. Finalmente, en el tercer bloque se estudió la degradación de los pigmentos de los AOVE en dos experimentos donde se expusieron las muestras a distintas situaciones para evaluar la pérdida de calidad según las bandas de absorción de sus espectros en la zona del visible. Las condiciones con las que se experimentaron fueron el tiempo, la temperatura y la presencia o ausencia de luz.

Los resultados obtenidos en cada uno de los bloques fueron realmente satisfactorios, consiguiendo errores entre los valores estimados y reales siempre inferiores al 6,5% y, en la mayoría de los casos, incluso menores al 3%, con lo que se puede decir que los perceptrones multicapa son modelos perfectamente viables para el desarrollo de herramientas auxiliares en el control de calidad de los AOVE.



## SUMMARY

## Neural Networks for the Analysis and Quality Control of Extra Virgin Olive Oil

Extra virgin olive oil (EVOO) is the juice extracted from the fruit (olive) of the olive tree (*Olea europaea* L.), exclusively obtained through mechanical processes without the use of any chemical agents. To qualify as EVOO, an olive oil must have, amongst other characteristics gathered in the current legislation, a free acidity lower than 1% and an absence of any sensory defects. These requirements are mentioned due to the fragility of this oil, which can see its composition affected by many variables whether within the production process or not, and it is therefore substantial to treat EVOO carefully so that its nutritional and organoleptic quality are not diminished. This extraordinary product plays a very important role within the Mediterranean diet and it is also known as “liquid gold” thanks to this and to its beneficial properties on human health, which make EVOO different from other seed oils. All of these attributes, its delicate elaboration, and the fact that it is a crucial product for the economy of the main producing countries, such as Spain, make the price of this edible oil one of the highest in the market. This has made illegal labelling and adulteration with lower quality oils a big problem to deal with in the olive oil sector, and the administration must offer consumers a good solution.

The well-deserved reasons to protect the reputation and quality of EVOOs have set-off a countless number of research projects with the aim of a better understanding of the processes and conditions that harm the traits of this functional food and also the development of technologies for adulterant detection, among others, in order to know how to obtain the finest juice of the olives and also defend consumers’ rights and the olive oil sector itself. It is necessary to keep EVOO in its best possible conditions, from its production until its consumption. This is why the goal of this research is to reveal the capability of artificial intelligence within the quality control of such treasured juice.

The analytical technique used for the analysis of EVOOs was UV-vis spectrophotometry, based on the absorption of the pigments present in these oils. The pigments belong to the non-saponifiable fraction of olive oils and are mainly chlorophylls and carotenes. The concentration

## SUMMARY

of such molecules inside EVOO is one of many ways of assessing its quality due to the worthy properties related to these pigments.

The absorption spectra contain large amounts of data which need to be treated in an appropriate way in order to get satisfactory results. Classic linear models are the most common but during this research, artificial neural networks based on non-linear algorithms were tested and it was demonstrated that they offer better statistical performance and applicability than linear models.

The main feature of the artificial neural networks designed is that they are effective mathematical tools able of finding non-linear relations between independent variables, which are the ones presented to the model, and dependent variables, being the ones giving the response or wanted information. Additionally, these tools are usually able of doing more accurate interpolations than classic linear models.

The goal of this Ph.D. was demonstrating that these non-linear networks are perfectly capable of transforming data acquired from fast, user-friendly, non-destructive, and low-cost analytical techniques (*vide supra*), such as UV-vis spectroscopy, into useful information with low estimative errors, able to assist in the quality control of EVOO.

The hypothesis was verified by means of a series of experiments that were divided into three sections: detection of adulterants, classification of monovarietal EVOOs and EVOO degradation. The first section involves two experiments, one based on the adulteration of four EVOOs with refined olive oil, and the other one on binary and ternary samples of one EVOO with soybean oil and sweet almond oil, to verify if the designed models were suitable for detecting and quantifying the adulterants added, only with data from UV-vis spectroscopy spectra. In light of the satisfactory results, for the second section a more difficult approach was attempted in which the aim was to classify and quantify binary and ternary blends of monovarietal EVOO, proving that the model was able to complete its task satisfactorily. Finally, in the third section, the degradation of the pigments present in EVOO was studied in two different experiments where the samples were exposed to multiple situations in order to evaluate the quality loss with the absorption spectra of the oils. The tested conditions were time, temperature, and light exposure.

The results achieved in each one of these sections were fairly attractive, getting errors, between estimated and real values, always below 6.5% for every experiment and for most of them even lower than 3%. Looking at these outcomes, it can be said that intelligent models are reliable algorithms for the development of tools capable of helping in the quality control of EVOOs.





# Redes Neuronales Para el Análisis y Control de Calidad del Aceite de Oliva Virgen Extra

## 1. INTRODUCCIÓN

A través de los tiempos, el olivo (*Olea europea*) ha sido utilizado por diversas culturas y considerado como fuente de riqueza y alimento, siendo de los cultivos más antiguos de la historia, datado, aproximadamente hace 5000 años en la zona de la antigua Persia y Mesopotamia (Boskou, 1996).

La cultura minoica surgida en la isla de Creta, en la Edad del Cobre y del Bronce, fue de las primeras en comerciar con el fruto y con el jugo extraído de este árbol (aceite de oliva virgen) entre los años 2000 y 1450 a.C., dando pie al conocimiento y consumo de estos productos en otros países mediterráneos (Aparicio y Harwood, 2013). La distribución del aceite de oliva se fue incrementando y haciéndose cada vez más importante en la cuenca mediterránea. Tanto fue así, que sobre el año 50 a.C., los griegos y los romanos empezaron a mejorar y desarrollar nuevos métodos para la obtención de este “oro líquido” (Aparicio y Harwood, 2013; Carreras-Monfort *et al.*, 2016).

El comercio del aceite de oliva fue significativo en la economía de antiguas civilizaciones y su legado es, hoy en día, de gran importancia para países tales como España, Italia, Grecia y Portugal, principales productores a nivel mundial, y miembros del Consejo Oleícola Internacional (COI), con un porcentaje de producción mundial del 37,8%, 12,9%, 10,5% y 4,1%, respectivamente, según los datos de la campaña 2017/2018 recogidos de la página web del COI y mostrados en la **tabla 1** (COI, 2018).

**Tabla 1.** Datos estimados de producción de aceite de oliva de los principales países productores de la campaña 2017/2018.

País productor	Producción (Mt)	Porcentaje según producción mundial (%)
<b>España</b>	1251,3	37,8
<b>Italia</b>	428,9	12,9
<b>Grecia</b>	346	10,5
<b>Portugal</b>	134,8	4,1
<b>Otros productores</b>	1150,5	34,7
<b>Mundial</b>	3311,5	100

Actualmente, y gracias al avance tecnológico, la producción del aceite de oliva virgen se desarrolla en una serie de etapas que se mencionarán más adelante. Hay que señalar que cuando estas se llevan a cabo de la forma correcta y con la utilización de frutos frescos de buena calidad, sin defectos ni alteraciones y con la adecuada madurez, el aceite de oliva posee excepcionales características de aspecto, fragancia y delicado sabor, pudiéndose consumir en crudo, conservando íntegramente su contenido de vitaminas, ácidos grasos esenciales y otras moléculas naturales de alto valor dietético.

El aceite de oliva de mayor calidad es llamado aceite de oliva virgen extra (AOVE); producto hoy en día mundialmente conocido por sus propiedades nutricionales, sensoriales y, demostradamente, preventivas o positivas (Visioli *et al.*, 2002; Covas *et al.*, 2006) frente a enfermedades diversas como las cardiovasculares (Stark y Madar, 2002; Visioli y Galli, 1998; Estruch *et al.*, 2013), el Alzheimer (Figueiredo González *et al.*, 2018), el Parkinson (Figueiredo González *et al.*, 2018) y algunos tipos de cáncer (Menéndez *et al.*, 2007), además de otros beneficios. Las distintas variedades de aceitunas que se cultivan producen aceites de diferentes tipos (Kosma *et al.*, 2016), existiendo más de 260 variedades españolas, cada una con sus características representativas de composición y propiedades.

Desgraciadamente no todo el aceite de oliva que se produce en el mundo reúne las condiciones para ser AOVE. Cantidades muy elevadas de este producto han de ser destinadas a un proceso de refinado, por no cumplir con las características establecidas en la reglamentación existente al respecto (*vide infra*), entre las que cabría destacar por su frecuencia, la elevada acidez libre y/o desagradables propiedades organolépticas. La experiencia demuestra

que esta falta de calidad se produce casi exclusivamente como consecuencia de una manipulación defectuosa de los frutos, así como de un proceso de elaboración conducido de forma inadecuada.

En cuanto a la producción de aceite defectuoso, se podría decir que exclusivamente las aceitunas que han sido atacadas por plagas, enfermedades o que han caído al suelo antes o durante el proceso de la recolección, llevan a aceites alterados fisicoquímicamente. El resto de la producción defectuosa es consecuencia de una recolección a destiempo, mal realizada y/o de una elaboración inadecuada (Alkan *et al*, 2011). También, debe tenerse en cuenta que el proceso de transporte y almacenamiento que sufre el AOVE elaborado antes de ser consumido afecta, en algunos casos, notablemente a la calidad de este.

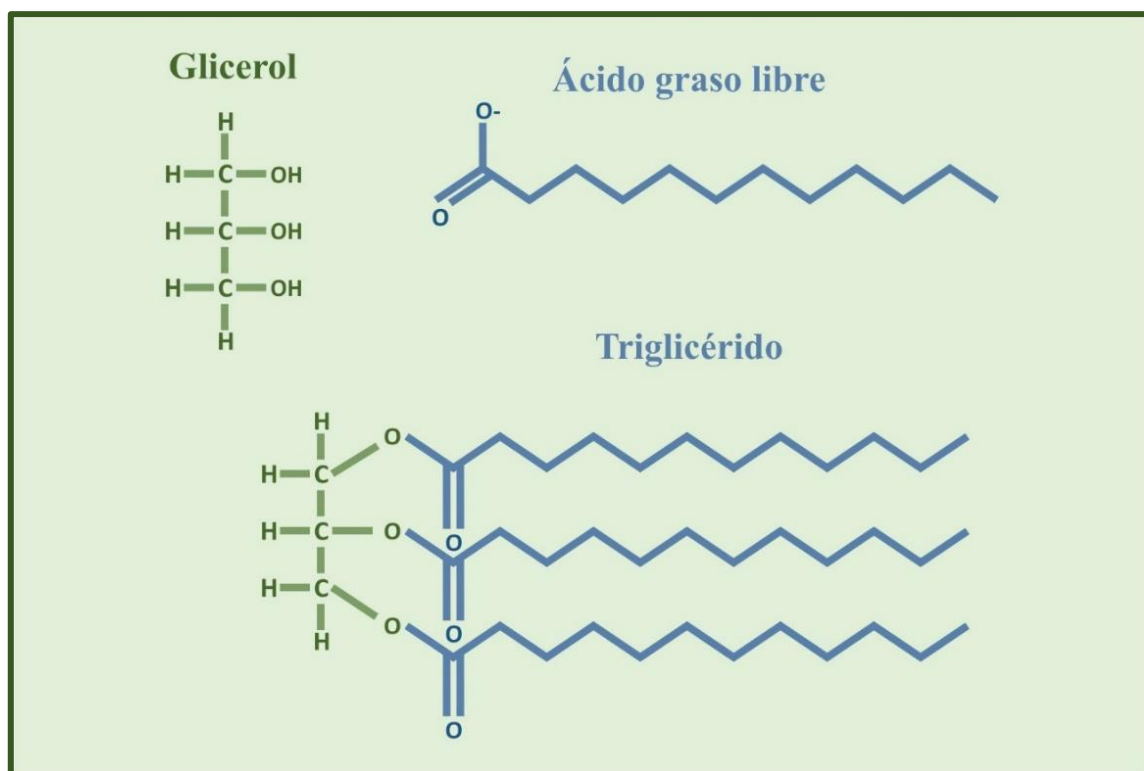
Para conocer más en detalle estos aspectos, en las siguientes secciones se detallarán la composición del AOVE, las etapas de su proceso de producción, calidad, y el impacto económico de este producto en los mercados tanto nacionales como internacionales.

### 1.1. Composición del aceite de oliva virgen extra

En general, el AOVE está compuesto por una fracción mayoritaria (97-99% en peso) saponificable y otra fracción minoritaria (1-3%) denominada insaponificable. La composición de estas dos fracciones depende de una gran cantidad de factores entre los que destaca la variedad de la aceituna, su grado de maduración en el proceso de recolección, las condiciones agronómicas y, por supuesto, su proceso de producción (Kosma *et al*, 2016; Bajoub *et al*, 2017; Alkan *et al*, 2011; Jolayemi *et al*, 2016). A continuación, se describirán cada una de estas dos fracciones mencionando su composición general.

#### 1.1.1. Fracción saponificable

La fracción saponificable contiene principalmente triglicéridos, que son compuestos lipídicos formados por una molécula de glicerol y tres ácidos grasos, de estructura variada, como se muestra en la **figura 1**.



**Figura 1.** Estructura de un triglicérido.

Los triglicéridos más abundantes en el AOVE son: el OOO (con tres moléculas de ácido oleico), el POO (con una molécula de ácido palmítico y dos de oleico), el OOL (con dos moléculas de ácido oleico y una de linoleico), el POL (con una molécula de ácido palmítico, una de oleico y otra de linoleico) y finalmente el SOO (con una molécula de ácido esteárico y dos de oleico), que representan aproximadamente los porcentajes en peso que se pueden apreciar en la **tabla 2** (Aparicio y Harwood, 2013).

**Tabla 2.** Triglicéridos más abundantes de los AOVE y su porcentaje en peso aproximado.

Triglicéridos	Porcentaje en peso (%)
OOO	43
POO	18
OOL	7
POL	6
SOO	5

Los diglicéridos y monoglicéridos también forman parte de la fracción saponificable, aunque, en cantidades menores que los triglicéridos antes mencionados. Son compuestos formados por una molécula de glicerol a la que se anclan dos o un ácido graso, respectivamente, y su presencia está relacionada con la hidrólisis del aceite. Por tanto, su cuantificación es una forma fiable de evaluar la calidad de los AOVE, ya que suelen estar en mayores concentraciones en aceites de baja calidad (Jabeur *et al.*, 2017).

Por último, los ácidos grasos libres responsables del grado de acidez de los aceites de oliva provienen de la lipólisis o rotura de los triglicéridos y los más importantes y abundantes son los que aparecen en la **tabla 3**, junto con su número de carbonos e insaturaciones (dobles enlaces), intervalo de cantidad relativa (%) y tipo. Se puede observar que estos ácidos grasos son los mismos que forman la mayoría de los triglicéridos.

**Tabla 3.** Ácidos grasos libres mayoritarios del AOVE.

Nombre	NºCarbonos: NºInsaturaciones	Porcentaje (%)	Tipo
Oleico	18:1	55-83	Monoinsaturado
Linoleico	18:2	3,5-21	Poliinsaturados
Linolénico	18:3	≤ 0,9	
Palmítico	16:0	7,5-20	Saturados
Esteárico	18:0	0,5-5	

### 1.1.2. Fracción insaponificable

La fracción insaponificable contiene los compuestos minoritarios del aceite, pero no por estar en bajas concentraciones (1-3% en peso) tienen menor importancia que la fracción saponificable. Esta fracción le confiere al aceite su sabor (Aparicio *et al.*, 1996), su característico color (Mapelli-Brahm *et al.*, 2018), las propiedades beneficiosas para la salud (Parkinson y Cicerale, 2016), como las antioxidantes (Martínez-Huélamo *et al.*, 2017), anticancerígenas (Corominas-Faja *et al.*, 2018; Menéndez *et al.*, 2007), antiinflamatorias (Wongwarawipat *et al.*, 2018) y preventivas contra enfermedades neurodegenerativas (Rodríguez-Morató *et al.*, 2015), entre otras. Estas características únicas le son proporcionadas a los aceites por compuestos tales como carotenos, polifenoles, clorofilas, y otros. En la **tabla 4** se pueden ver las clases fundamentales de estos compuestos junto con algunas de sus funciones caracterizadas.

**Tabla 4.** Tipos de compuestos que componen fundamentalmente la fracción insaponificable del AOVE.

Compuesto	Función principal	Bibliografía
Carbohidratos	Biosíntesis de esteroides	Simcox <i>et al.</i> , 1979; Tekaya <i>et al.</i> , 2014.
Tocoferoles	Antioxidante	Sayago <i>et al.</i> , 2007
Alcoholes alifáticos	Formación de ceras	Mariani <i>et al.</i> , 2018
Esteroides	Anticancerígena y antiinflamatoria	Ramprasath <i>et al.</i> , 2015; de la Puerta <i>et al.</i> , 2000.
Pigmentos	Color	Giuffrida <i>et al.</i> , 2011.
Compuestos fenólicos	Antioxidante y anticancerígena	Servili <i>et al.</i> , 2014; Visioli <i>et al.</i> , 2002.
Compuestos volátiles	Propiedades organolépticas	Salas <i>et al.</i> , 2013; Genovese <i>et al.</i> , 2018.

## 1.2. Producción del aceite de oliva virgen extra

Como ya ha sido mencionado, las características específicas del AOVE le hacen ser considerado como un auténtico jugo de fruto. Para que este zumo ofrezca las mejores características, los procesos involucrados en su extracción deben de ser realizados con el máximo cuidado. Como se indicará, los procesos de recolección, limpieza, elaboración y conservación son fundamentales en la calidad del producto final.

El AOVE se forma en un proceso denominado lipogénico que comienza en el propio árbol y finaliza en la aceituna antes de ser recolectada, para posteriormente ser extraído mediante métodos físicos. Para obtener AOVE acorde a la reglamentación vigente, es necesario saber que la calidad y sus características no dependen solamente del sistema de elaboración, sino que existen una serie de factores influyentes (Barranco *et al.*, 2017; Lukić *et al.*, 2017) que se recogen en la **figura 2**.



**Figura 2.** Esquema de producción del AOVE.

Cada una de estas etapas está compuesta por una serie de pasos que tienen que llevarse de forma continua, cuidando los tiempos y, sobre todo, las condiciones de operación (**figura 2**). Al ser un proceso secuencial desde la recolección hasta el almacenamiento, cualquier error dentro de la cadena es arrastrado a las siguientes etapas y, por ello, al producto final sin capacidad de revertir lo ocurrido. Asimismo, como es un proceso en continuo, este defecto puede afectar a toda la producción. A continuación, se mostrarán en más detalle cada una de las etapas descritas en la **figura 2**.

### 1.2.1. Operaciones preliminares

La primera etapa de las operaciones preliminares es la recolección. Las aceitunas se recogen del árbol directamente en el momento en que su maduración se considera óptima, ya sea manualmente o con máquinas que faciliten el trabajo. Este proceso influye sensiblemente en las características del AOVE producido. Le afecta desde el momento en que debe realizarse, hasta el sistema a emplear. En cuanto al momento, la aceituna debe ser recogida cuando está en su punto de su madurez óptima, considerando como tal, el estado en el que el fruto tenga la máxima cantidad de contenido graso y proporcione las mejores características para facilitar las etapas posteriores. Para conocer, dentro de lo posible, este momento, deben realizarse controles periódicos del índice de madurez de las aceitunas (Uceda y Frías, 1975; Montaña, 2016).



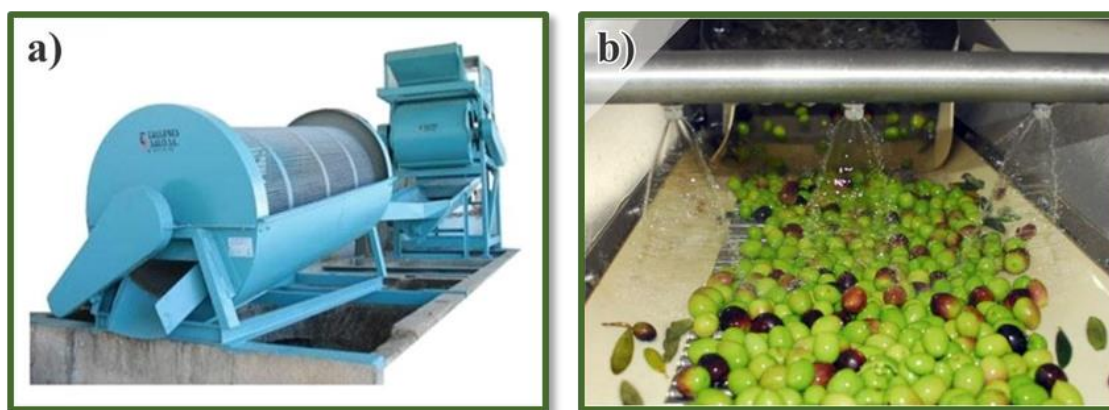
## INTRODUCCIÓN

En cuanto al sistema de recolección, debe tenerse siempre en cuenta la idea de que el AOVE es considerado un “zum de fruto”, por lo que se deberían utilizar técnicas de recogida que no deterioren las aceitunas. Los golpes que puedan recibir las aceitunas pueden incluso llegar a la rotura del epicarpio (la piel o parte más externa del fruto) comenzando un proceso de degradación que se traducirá en un AOVE de peor calidad. Por ello, se recurre a métodos de recolección como el “ordeño”, dado que, al recoger manualmente, el daño a la aceituna es mínimo (**figura 3**). Por el contrario, el “vareo” es un método basado en impactar físicamente al olivo y, por lo tanto, los daños al epicarpio de la aceituna son más comunes, cosa que compromete o perjudica la calidad del AOVE producido (**figura 3**) (Aparicio y Harwood, 2013). Si bien depende también de los procesos posteriores, habitualmente el ordeño produce un AOVE de mejor calidad, aunque la rentabilidad económica es menor debido a que las toneladas de aceitunas recogidas son menores por unidad de tiempo.



**Figura 3.** Recolección de aceitunas por la técnica del a) “vareo” y b) “ordeño”.

Las aceitunas que llegan a las almazaras llevan cierta suciedad en forma de tierra, piedras, ramas, hojas, etc. Para que estos cuerpos ajenos a los frutos no dañen el AOVE, ni los equipos que se van a usar durante todo el proceso de producción, es necesario llevar a cabo una etapa de lavado. En esta etapa se utilizan limpiadoras de aire comprimido, para eliminar los cuerpos de menor densidad, y lavadoras con agua para eliminar los de mayor densidad (**figura 4**).



**Figura 4.** Lavadoras de aceituna: a) de aire comprimido y b) con agua.

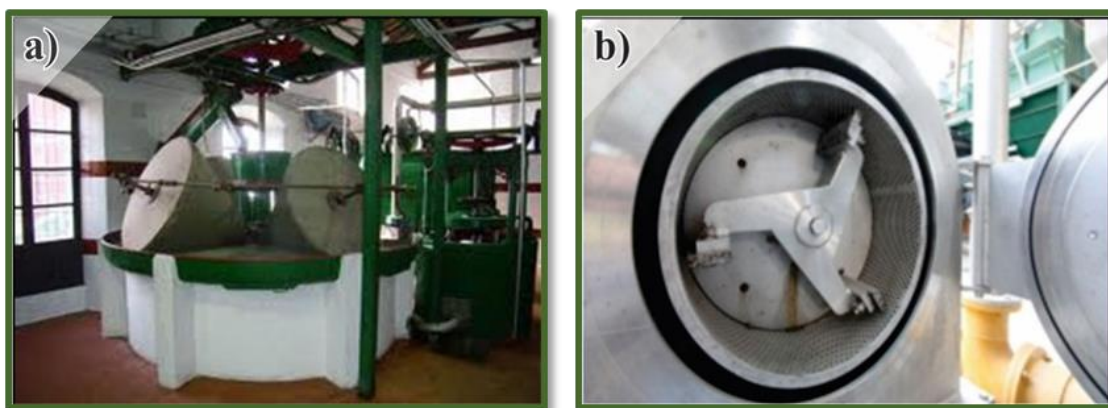
Una vez concluidas las operaciones preliminares, y teniendo las aceitunas limpias en la almazara, comienza la etapa de preparación de la pasta, que se detalla a continuación.

### 1.2.2. Preparación de la pasta

Esta fase tiene por objetivo separar el AOVE que se encuentra disperso en la fase oleosa del fruto. Con el objetivo de conseguir la mejor calidad, es imprescindible que en esta etapa no se originen alteraciones en la composición ni en las características organolépticas de la aceituna que se va a tratar. Para ello es necesario realizar los siguientes procesos.

#### 1.2.2.1. Molienda

El primer paso es la molturación de las aceitunas, y se lleva a cabo mediante molinos de piedra o de martillos de acero inoxidable (**figura 5**). En el segundo paso, el fruto se moltura hasta que su diámetro sea inferior al tamaño de la criba. El diámetro de paso de la criba, que varía entre 5 y 7 mm, según la madurez de las aceitunas y el método posterior de extracción (Torrecilla, 2010), interviene directamente en la liberación del aceite y, por lo tanto, en el tiempo y la velocidad de molturado (Polari *et al.*, 2018), influyendo así en el rendimiento o cantidad final de aceite de la aceituna molturada.

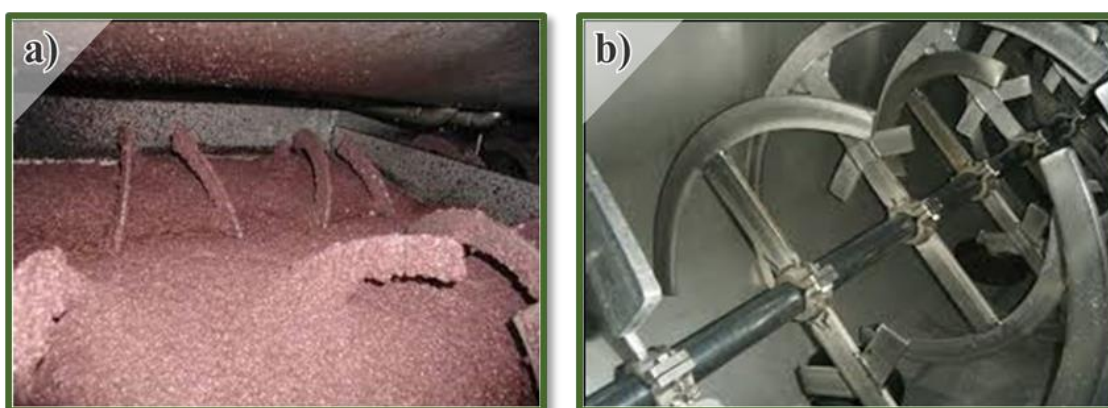


**Figura 5.** a) Molino de prensa y b) molino de martillos de acero inoxidable.

El objetivo de este paso es destruir la estructura de los tejidos vegetales que la conforman, desgarrándose las membranas celulares, dejando al descubierto glóbulos de grasa, de tamaño variable. Estas pequeñas gotas entran en contacto con la fase acuosa presente en la pasta y del residuo con el que, previamente, se lavaron las aceitunas. Las proteínas, disueltas en el agua, forman emulsiones, comunicando a las gotas una considerable estabilidad (Barranco *et al.*, 2017; Aparicio y Harwood, 2013).

### 1.2.2.2. Batido

Todos los trituradores empleados, en especial los metálicos, necesitan estar complementados por batidoras (**figura 6**). En este proceso se efectúa el cizallamiento de las partes no suficientemente tratadas en la molienda, y se agrupan las gotas de aceite en una sola fase oleosa continua, lo cual facilita el proceso de extracción.



**Figura 6.** Batidora de pasta de aceituna a) en funcionamiento y b) vacía.

La velocidad de batido de la pasta de aceitunas debe estar en torno a 15-20 rpm, y la temperatura controlada a unos 25°C, evitándose superar los 30°C para minimizar tanto la degradación como las pérdidas de compuestos volátiles. Este paso facilita la reunión de los glóbulos de aceite en gotas de mayor tamaño, desligándose de los sólidos de dicha pasta y de la fase acuosa (Torrecilla, 2000).

### 1.2.3. Extracción sólido-líquido

Aunque todas las operaciones influyen notablemente en la calidad del producto, esta etapa constituye la parte fundamental de la obtención del AOVE. Esta operación está basada en la separación física de los líquidos oleosos contenidos en la pasta de las aceitunas. Existen diversas alternativas para realizar esta extracción, y los métodos más empleados se detallan a continuación (Aparicio y Harwood, 2013).

#### 1.2.3.1. Filtración selectiva

Una vez terminado el batido de la pasta, existe la posibilidad de adquirir una buena porción del aceite obtenido en dicha etapa. Esto se consigue llevando a cabo una extracción en frío, por filtración selectiva. El aceite conseguido de esta forma es el de mayor calidad ya que posee las mejores características organolépticas, alta estabilidad, índices adecuados de peróxidos y acidez, etc., pero su coste es elevado debido al bajo rendimiento que se obtiene con esta técnica y por tanto no todas las empresas lo llevan a cabo. Es recomendable que la industria olivícola disponga de un sistema de extracción parcial, acompañado por decantación y/o centrifugación, para tratar por separado estos aceites de calidad y poderlos almacenar también por separado (Hermoso *et al.*, 1991). Una vez aislada esta primera parte del aceite, la pasta pasa por los siguientes métodos de extracción mecánica para obtener mayor cantidad de aceite (Barranco *et al.*, 2017).

#### 1.2.3.2. Extracción por presión

La forma tradicional de conseguir la separación de las fases sólida y líquida es mediante la presión que suministra una prensa hidráulica (**figura 7**). La fuerza aplicada a la pasta debe ser mayor que la resistencia que se opone al desplazamiento y al pasar a través de unos discos filtrantes llamados capachos.





**Figura 7.** Prensa hidráulica.

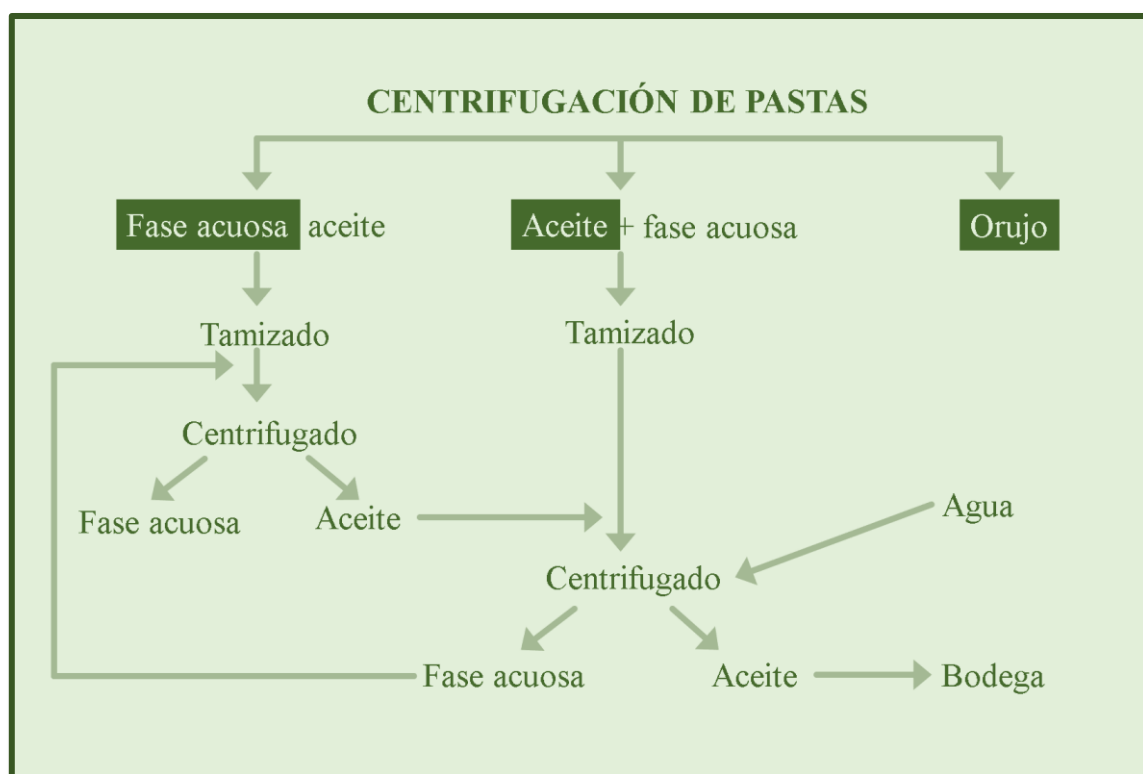
Históricamente, los capachos se construían de esparto con las dificultades de suciedad y variabilidad de espesor que ello presentaba. Es debido a ello que hoy en día se fabrican utilizando fibras sintéticas, para facilitar su limpieza, y controlar su espesor ideal (cilindro de espesor inferior a tres centímetros). Estos capachos se disponen centrados en un eje y ejercen una presión homogénea sobre la pasta. Para que la presión se distribuya por igual en toda la pasta de aceituna, se colocan unas placas metálicas cada tres o cuatro capachos. La presión máxima que debe alcanzar la prensa no puede superar los 400 bares (Torrecilla, 2000; Aparicio y Harwood, 2013). Esta presión final es alcanzada tras un aumento gradual que puede tardar entre 45 minutos y una hora. Una vez conseguida dicha presión, se deja actuar durante 10-20 minutos, para obtener la mayor cantidad de fase líquida (agua + aceite) posible. Después de cada prensado, es fundamental limpiar bien los capachos ya que, si queda pasta en ellos, esta se fermentaría y los aceites adquiridos posteriormente sufrirían dicha contaminación y se degradarían a mayor velocidad (Torrecilla, 2010).

Este método de extracción física no es muy utilizado actualmente a nivel industrial puesto que representa un sistema discontinuo y existe el riesgo de contaminación por suciedad, con el consiguiente deterioro del aceite producido. Es por esto que se ofrecen otras formas de extracción basadas en la fuerza centrífuga que se aplica a la pasta.

### 1.2.3.3. Extracción por centrifugación de pasta

La separación sólido-líquido de la pasta se consigue gracias a la utilización de la fuerza centrífuga. Se lleva a cabo en aparatos que funcionan en “fase dinámica”, es decir, donde los sólidos se van desplazando a lo largo del eje de giro y se descargan continuamente.

Antiguamente, los sistemas de elaboración de aceite de oliva por centrifugación directa respondían al esquema que se muestra como sistema de centrifugación llamado “de tres fases” (**figura 8**). Se denomina de tres fases porque el sistema de centrifugación separa la pasta procedente de la batidora en tres fases diferentes; una sólida que es el “orujo”, otra líquida nombrada “alpechín” y finalmente la oleosa que es de donde procede el AOVE (Torrecilla, 2010; Baccioni y Peri, 2014).

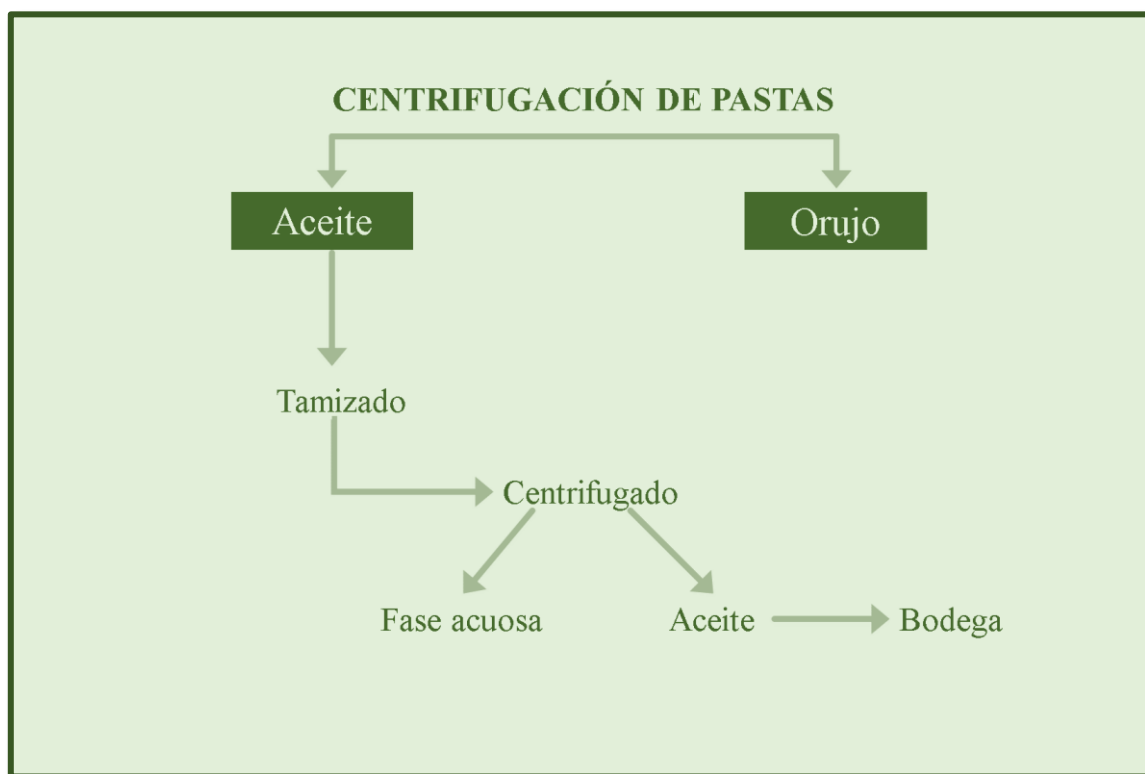


**Figura 8.** Esquema de centrifugación en tres fases.

A finales del siglo pasado, con la necesidad de reducir los vertidos y mejorar la calidad del AOVE (Ley 10/1993 sobre vertidos líquidos industriales al sistema integral de saneamiento, BOE-A-1993-31103), la tecnología evolucionó, diseñando y poniendo en marcha los actuales sistemas de centrifugación denominados “de dos fases” (**figura 9**) (Barranco *et al.*, 2017; Aparicio y Harwood, 2013). Estos sistemas de centrifugación tienen dicho nombre ya que

## INTRODUCCIÓN

separan la pasta de entrada procedente de la batidora en dos fases; una oleosa de donde proviene el aceite y otra sólida-líquida llamada comúnmente “alpeorujo”. Estos sistemas son capaces de funcionar con el menor caudal posible de agua en el decantador centrífugo, generando así una menor cantidad de residuos.



**Figura 9.** Esquema de centrifugación en dos fases.

El sistema de centrifugación de dos fases consta de un rotor cilíndrico-cónico giratorio y un rascador helicoidal de eje hueco. La separación se produce aplicando una velocidad de giro de entre 3000-4000 rpm. Al ser sometida la pasta de aceituna a la acción de la fuerza centrífuga, los sólidos, de mayor densidad que los líquidos, se pegan a la pared interna del rotor, y son arrastrados hacia un extremo por el tornillo sinfín (Torrecilla, 2010).

La extracción basada en el sistema de dos fases presenta unas características más beneficiosas que los anteriores sistemas de extracción, si se tienen en cuenta los espacios requeridos para los procesos de producción, los tiempos de sus respectivas etapas, la generación de residuos y por supuesto la calidad del AOVE resultante. Por otro lado, también presenta aspectos negativos fundamentalmente centrados en la inversión económica que se requiere para poner en marcha un sistema de molturación basado en este tipo de centrifugación.

#### 1.2.4. Extracción líquido-líquido

El líquido que se obtiene de las prensas y las centrífugas (de dos o tres fases) no es únicamente aceite, sino una mezcla con agua procedente del contenido acuoso de la propia aceituna y la que se añadió en la etapa anterior (en caso de extracción por centrifugación). También puede haber una pequeña fracción sólida que haya escapado a la retención de los capachos o centrífugas (dependiendo del método de extracción sólido-líquido). En líneas generales, se puede estimar un 30% de aceite, un 60% de fase acuosa y el resto de sólidos (Barranco *et al.*, 2017), por lo que se necesita un sistema de separación, lo más eficiente posible, de las partes presentes en la fase oleosa para la obtención de aceites de calidad.

Los procedimientos existentes en la actualidad para la separación son la decantación natural o gravitatoria, centrifugación vertical o una combinación de ambas.

##### 1.2.4.1. Decantación

El método utilizado se basa en las diferencias de densidades existentes entre el AOVE ( $0,915-0,918 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) y la fase acuosa ( $1,015-1,086 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ). Esta separación de las dos fases líquidas por decantación natural se realiza en una serie de depósitos de mampostería comunicados entre sí y revestidos de azulejos o de materiales como poliéster con fibra de vidrio o acero inoxidable (Barranco *et al.*, 2017; Torrecilla, 2010). En este proceso de decantación gravitatoria se debe tener en cuenta la temperatura ambiente, el contacto con el agua que progresivamente se va separando y el tiempo necesario para la apropiada separación agua-AOVE. Todas estas condiciones, en algunos casos, causan un deterioro del propio aceite en el proceso de decantación (Torrecilla, 2010). Otra cosa a tener en cuenta es el espacio necesario para que la decantación ocurra de la forma adecuada.

Es debido a ello que para proteger la calidad del AOVE producido, es necesario contar con sistemas de separación más rápidos, como es el caso de las centrífugas verticales que se describen a continuación.

##### 1.2.4.2. Centrifugación

Con la evolución de los materiales y los equipos, progresivamente se ha ido sustituyendo el proceso de decantación gravitatoria por técnicas basadas en la centrifugación (**figura 10**). Estos equipos giran a velocidades de entre 6000-8000 rpm, pero, en este caso, en el plano



## INTRODUCCIÓN

vertical. De esta forma, el tiempo empleado en la separación es notablemente más corto, y a su vez, la capacidad de producción también es mayor (Torrecilla, 2010).



**Figura 10.** Centrífuga vertical.

El aceite que sale de la centrífuga vertical debe hacerse pasar por pequeños decantadores para eliminar el aire acumulado en este proceso. Posteriormente, se hace la clasificación por calidad del aceite para poder ser almacenado según sus características.

Los factores que hay que controlar en esta operación para mantener los criterios de calidad del AOVE son la homogeneidad del líquido a centrifugar, el caudal de alimentación, la temperatura, el caudal de agua de adición y el tiempo de trabajo entre descargas (Barranco *et al.*, 2017; Torrecilla, 2010).

### 1.2.5. Almacenamiento del aceite

Una vez extraído, el AOVE se almacena en grandes contenedores de materiales totalmente impermeables e inertes (acero inoxidable) para evitar reacciones de degradación con su superficie y se mantiene alejado de la luz y del oxígeno del aire, hasta el momento de su transporte para ser envasado (**figura 11**) (Barranco *et al.*, 2017; Torrecilla, 2010).



**Figura 11.** Contenedores de acero inoxidable para almacenar el AOVE.

Los depósitos se llenan por completo y son purgados continuamente (depósitos con fondo cónico o en plano inclinado con grifo) o se les introduce nitrógeno u otros gases no oxidantes para mantener el aceite en las mejores condiciones posibles hasta su envasado. Es recomendable que la bodega se mantenga a una temperatura casi constante, entre 15-18°C. Por otro lado, se debe evitar el acceso o deposición de materiales u objetos que puedan alterar el aroma del aceite almacenado (Barranco *et al.*, 2017; Aparicio y Harwood, 2013).

### 1.3. Clasificación de aceites de oliva

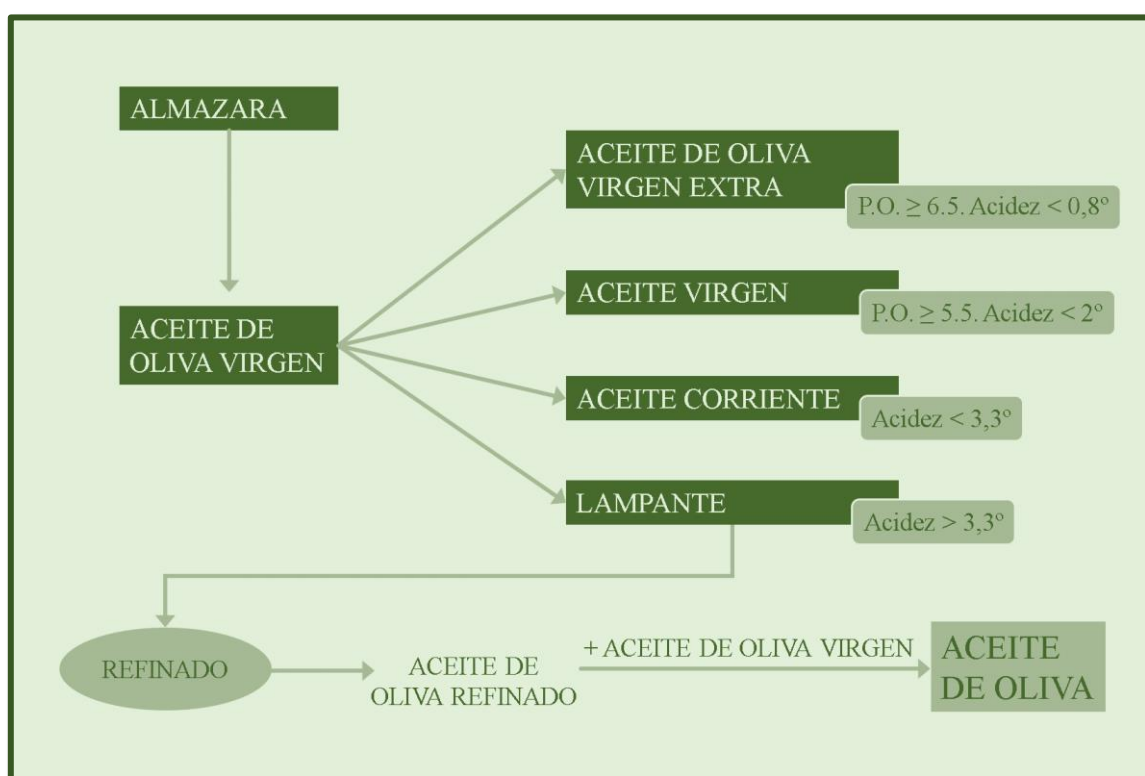
La calidad aromática del aceite de oliva es uno de los factores que más influye en la preferencia de los consumidores y se le conoce también como las propiedades organolépticas, que dependen de más de un centenar de compuestos volátiles de la fracción insaponificable del aceite (Torrecilla, 2010; Barranco *et al.*, 2017).

No todos los aceites de oliva producidos tienen las mismas características químicas, físicas ni organolépticas debido a las diferentes variedades de aceituna, condiciones climáticas locales, recogida de la aceituna en diferentes grados de madurez, mecanismo de obtención del aceite, conservación del aceite, etc. (Boselli *et al.*, 2009; Jabeur *et al.*, 2015; Köseoğlu *et al.*, 2016; Bubola *et al.*, 2017; Lukić *et al.*, 2017; Malheiro *et al.*, 2018). Pero todas ellas pueden ser clasificadas en función de su calidad bajo el mismo patrón. Esta variación de calidad en su

## INTRODUCCIÓN

composición hace que el aceite de oliva virgen se pueda clasificar en los siguientes cuatro grupos, que aparecen también representados en la **figura 12**, según información obtenida en la página web del COI (COI, 2018) y el CODEX STAN 33-1981 encargado de establecer las normas para los aceites de oliva y aceites de orujo de oliva (CODEX STAN):

1. **Aceite de oliva virgen extra:** es el de mayor calidad, posee propiedades organolépticas excepcionales (sin defectos y nivel frutado detectable por un panel de cata) y su nivel de acidez no puede superar  $0,8^\circ$ .
2. **Aceite de oliva virgen:** la calidad sigue siendo buena y su nivel de acidez no puede superar los  $2^\circ$ .
3. **Aceite de oliva corriente:** es el aceite de oliva virgen cuya acidez es como máximo de  $3,3^\circ$ .
4. **Aceite de oliva lampante:** es el de menor calidad, con un nivel de acidez superior a  $3,3^\circ$ . Necesita ser refinado para posibilitar el consumo humano.



**Figura 12.** Clasificación de aceites de oliva de presión según el Consejo Oleícola Internacional, COI (COI, 2018).

Otras características de los AOVE que nos permiten distinguirlos de los otros aceites de oliva según el CODEX STAN 33-1981 son los parámetros  $K_{270}$  y  $K_{232}$  de absorbancia en el

ultravioleta y su composición en desmetilesteroles. Los valores de  $K_{270}$  y  $K_{232}$  no pueden ser mayores a 0,22 y 2,5, respectivamente y la cantidad permitida de desmetilesteroles se puede observar en la **tabla 5**.

**Tabla 5.** Cantidad permitida de desmetilesteroles en los AOVE.

Desmetilesterol	Cantidad según el contenido total de esteroides
Estigmasterol	$\leq 1,4\%$
$\Delta$ -7-estigmasterol	$\leq 0,3\%$
Estigmastadienos	$\leq 0,05$ mg/kg

El aceite de oliva lampante es el de peor calidad y no puede ser consumido, por lo que es sometido a un proceso de refinado. De este proceso de refinado se obtiene un aceite insípido, incoloro y sin aromas. Para poder distribuirlo comercialmente, es necesario mezclarlo con aceite de oliva virgen o AOVE para recuperar parcialmente sus características organolépticas y convertirlo en el llamado “aceite de oliva”, ya apto para el consumo.

Es importante destacar, según se ha mencionado, que debido a lo laborioso que es obtener AOVes con unas características sobresalientes de calidad, su precio de venta suele ser más elevado que el de otros aceites vegetales. Esta diferencia de precio y margen económico provoca que se cometan actividades fraudulentas ilegales, y es por ello que su detección se aborda aquí como uno de los principales objetivos del trabajo.

#### 1.4. Fraude alimentario

Según la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*U.S. Food and Drug Administration* (FDA); (FDA, 2018)), el fraude alimentario es un término colectivo utilizado para abarcar la sustitución deliberada e intencional, la adición, la manipulación indebida o la tergiversación de alimentos, ingredientes alimenticios o envases de alimentos; o declaraciones falsas o engañosas sobre un producto, con fines económicos.

Este tipo de actividades ilícitas, aunque no representan ninguna novedad, han sido y siguen siendo un gran problema dentro del sector alimentario a nivel mundial, y es por esto que existen muchas instituciones tanto a nivel nacional como internacional, encargadas de la seguridad de los alimentos y la lucha contra este tipo de fraude, entre otras labores, como por ejemplo, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (*Food and*

## INTRODUCCIÓN

*Agriculture Organization*), la FDA, la Agencia de Normas de Seguridad Alimentaria de la Unión Europea (*Food Standards Agency* (FSA)), la Federación de Alimentos y Bebidas (*Food and Drink Federation* (FDF)), la Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas, la Asociación Española de Denominaciones de Origen y, concretamente centrado en el campo de los aceites de oliva, el Consejo Oleícola Internacional (COI).

El fraude alimentario es un concepto general que incluye los distintos tipos que se muestran a continuación (FDA, 2018; FDF, 2018; FSA, 2018; SFO, 2018):

- **Adulteración:** se produce cuando un elemento del producto final, listo para su comercialización, es fraudulento.
- **Alteración:** se produce en el caso de que tanto los productos legítimos como los envases se usan de forma fraudulenta.
- **Rebasamiento:** siendo el producto legítimo, se fabrica en mayores cantidades a las acordadas (subnotificación de la producción)
- **Robo:** Se produce en el caso de que el producto legítimo sea robado y se hace pasar como legalmente adquirido.
- **Desviación:** se produce cuando la venta o distribución del producto legítimo tiene lugar fuera de los mercados previstos para la comercialización.
- **Simulación:** cuando un producto fraudulento está diseñado para ser parecido, pero no exactamente igual al producto legítimo.
- **Falsificación:** se produce cuando se copian alimentos populares, pero no se fabrican con las mismas garantías de calidad y seguridad alimentaria. Asimismo, se considera una violación de los derechos de propiedad intelectual.

Los altos precios del AOVE genuino y la facilidad tanto de obtener aceites de menor calidad como la de mezclarlos con los aceites de peor calidad, hacen que la adulteración sea uno de los tipos de fraude más comunes en el sector oleícola. En estos casos, aparte de ser una violación de la ley y un engaño hacia el consumidor, las adulteraciones con sustancias de menor calidad también pueden ser perjudiciales para la salud. Ejemplo de todo esto se tiene en el trágico caso del síndrome del aceite tóxico (SAT) que afectó a más de 20000 personas causando al menos 2500 muertes, por su contenido en derivados de anilina añadido al aceite antes de ser consumido (Solis-Herruzo *et al.*, 1987; Leal-González *et al.*, 1984; Messeguer, 2011; Cavallo *et al.*, 2018).

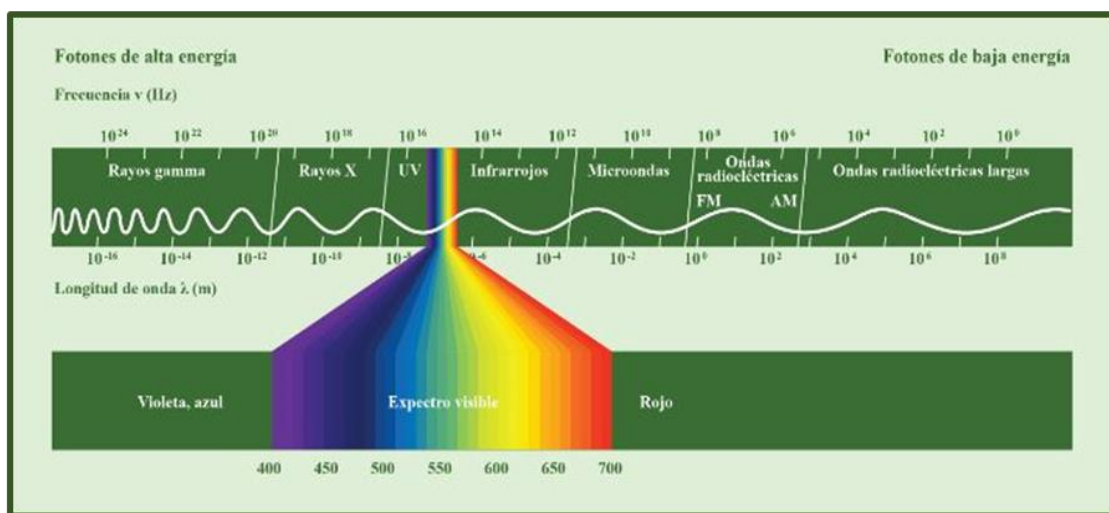
El gran impacto del SAT y otros casos de fraude en distintos alimentos como la carne (Thienes *et al.*, 2018; Wiedemair *et al.*, 2018) o la miel (Oroian *et al.*, 2018; Siddiqui *et al.*, 2017), ha originado muchos trabajos de investigación sobre adulteraciones en los alimentos (Dias y Mendes, 2018). En muchos tipos de alimentos, y especialmente para los AOVE, existen dos tipos de medidas preventivas que son los certificados protegidos de denominación de origen (Liu *et al.*, 2018) y la utilización de determinadas técnicas analíticas para la detección de adulterantes, como, por ejemplo, la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (Rohman, 2014), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear (Rezzi *et al.*, 2005), cromatografía de líquidos (Arslan y Özcan, 2011), espectroscopia de fluorescencia sincronizada, etc.

Considerando la adición de diversos compuestos o aceites de menor calidad al AOVE como una fuente de adulteración, se podrían mencionar algunos adulterantes que existen como los aceites de oliva de menor calidad (aceite de oliva refinado, o aceite de oliva de orujo) o aceites de semilla (Garrido-Delgado *et al.*, 2018). Estos aceites añadidos en cantidades menores al 10% en peso son difícilmente perceptibles por no expertos del sector oleícola. Es por esto, que la importancia de la innovación en las técnicas analíticas y quimicométricas que ayuden a evitar este tipo de actividades ilícitas sean cada vez más importantes para proteger al consumidor y al propio mercado.

### 1.5. Análisis espectrofotométrico y su tratamiento matemático

En este apartado se explicarán el origen y los fundamentos de la técnica analítica utilizada para el análisis de muestras de AOVE y el tratamiento matemático utilizado para el tratamiento de esta información. Toda la investigación está enfocada al desarrollo de herramientas inteligentes para la prevención de actividades fraudulentas, como la adulteración del AOVE.

Los métodos ópticos de análisis son aquellos que miden la radiación electromagnética que emana de la materia o que interacciona con ella. Se incluyen, por tanto, todas las regiones del espectro electromagnético, desde los rayos gamma hasta las ondas de radio. A continuación, en la **figura 13**, se muestra el espectro electromagnético donde se observan los distintos tipos de radiación, sus frecuencias y longitudes de onda correspondientes (Olsen, 2010).



**Figura 13.** Espectro electromagnético (Ahlbom *et al.*, 2008).

## 1.5.1. Clasificación

Los métodos ópticos se dividen en dos grupos fundamentales, los espectroscópicos y los no espectroscópicos. Los primeros son muy importantes en el análisis de alimentos (Esteki *et al.*, 2018; Callao y Ruisánchez, 2018) y se basan en la medida y la longitud de onda de la energía radiante debida a transiciones entre estados de energía; los segundos en una interacción entre la radiación electromagnética y la materia que produce como resultado un cambio en la dirección o en las propiedades físicas de la radiación electromagnética (Olsen, 2010). Se puede definir la radiación electromagnética como la propagación de energía a través del espacio. Clásicamente se ha atribuido a su naturaleza ondulatoria, pero ahora se conoce que la radiación tiene una conducta fotónica, lo cual indica que se comporta como pequeños haces de energía.

Los métodos ópticos más utilizados son los espectroscópicos, y en la mayoría de ellos, el mecanismo de interacción se basa en la absorción o emisión de energía. Los métodos espectroscópicos se identifican fácilmente porque llevan el prefijo *espectro*. Estos métodos generan una gran variedad de espectros, los cuales se mencionan a continuación.



### 1.5.2. Tipos de espectros

Todos los espectros pueden dividirse en tres tipos fundamentales: espectros de emisión, de absorción y Raman. A continuación, se clasifican los métodos espectroscópicos en función de estos (**tabla 6**), y se describen brevemente los tres tipos de espectros.

**Tabla 6.** Clasificación de los métodos espectroscópicos.

Espectros de absorción	Espectros de emisión	Espectros Raman
Espectrofotometría de ultravioleta y visible	Espectroscopia de emisión	Espectroscopia Raman
Espectrofotometría de infrarrojo	Espectroscopia de llama	
Absorción atómica	Espectrofluorimetría	
Espectroscopia de microondas	Espectrofosforimetría	
Espectroscopia de absorción de rayos X	Espectroscopia de emisión de rayos X	
Espectroscopia de resonancia magnética nuclear	Espectroscopia de rayos gamma	
Espectroscopia de resonancia de spin electrónico		
Espectroscopia Mössbauer		

#### 1.5.2.1. Espectros de absorción

La absorción es el fundamento de los métodos espectroscópicos en todo el espectro electromagnético (Harris, 1996; Skoog *et al.*, 2005, cap. 24). El proceso de absorción puede representarse por las reacciones:



En las reacciones 1 y 2, X, X\*,  $h$ ,  $\nu$  representan respectivamente el estado fundamental y excitado de un compuesto dado, la constante de Planck y la frecuencia de la radiación incidente. La ecuación (1) engloba los procesos de absorción de importancia mientras que la ecuación (2) representa la disipación posterior de la energía absorbida y en la **figura 14** se muestran las transiciones entre niveles energéticos que representan tanto la absorción como la disipación de la energía mencionada.



## INTRODUCCIÓN

Cabe mencionar que para que una radiación electromagnética sea absorbida por la materia deben cumplirse dos condiciones generales:

- Debe haber una interacción entre campo eléctrico de la radiación y alguna carga eléctrica de la sustancia.
- La energía de la radiación debe ser exactamente igual a la energía cuantizada que requiere la sustancia.

### *1.5.2.2. Espectros de emisión*

Los espectros de emisión se deben a un proceso exactamente inverso al de la absorción (Harris, 1996):



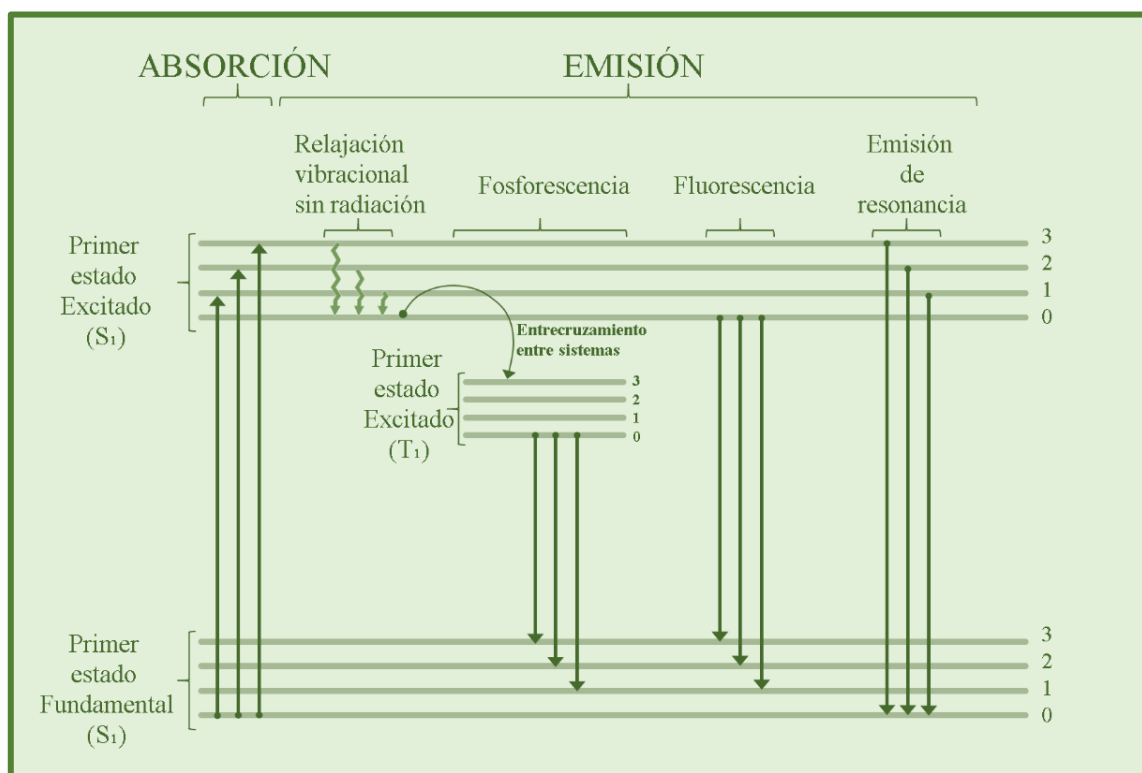
Con respecto a la emisión, la sustancia pasa de un estado excitado  $X^*$  a uno de menor energía  $X$ , emitiendo radiación. Pueden identificarse varios tipos de procesos de emisión, cuya diferencia radica en cómo se obtiene el estado excitado:

- Emisión del núcleo radiactivo: los núcleos de las sustancias radiactivas pueden desintegrarse espontáneamente emitiendo rayos gamma. La energía a la que da lugar es característica del núcleo emisor. El único método espectroscópico en este tipo de emisión es la espectroscopia de rayos gamma.
- Emisión después de la absorción de radiación electromagnética: algunas sustancias pueden desactivarse por los siguientes mecanismos de emisión: resonancia, fluorescencia y fosforescencia.
- La emisión a partir de una excitación no electromagnética se basa en el uso de energía no electromagnética para llevar al átomo o a la molécula al estado excitado. Esta estimulación se lleva a cabo a través de bombardeo de electrones de elevada energía.
- La emisión por resonancia es un fenómeno poco frecuente. Tiene lugar cuando un átomo o una molécula que ha absorbido una determinada radiación vuelve al estado fundamental emitiendo una radiación con la misma frecuencia que la radiación incidente. Esto se da en átomos aislados, sin que se produzcan choques entre sí ni con otras especies.

### 1.5.2.3. Espectros Raman

En este proceso interviene un tipo especial de dispersión en el que la molécula es excitada a un nivel que no pertenece a la molécula, sino que corresponde a la radiación de excitación (Harris, 1996).

Se dice que tiene lugar la dispersión cuando la radiación incidente induce un momento dipolar en el átomo o molécula. Las dispersiones producidas pueden ser: de la misma frecuencia (de *Rayleigh*), de una frecuencia inferior (de *Stokes*) o de una frecuencia mayor (de *anti-Stokes*) (Ríos, Moreno y Simonet, 2012).



**Figura 14.** Transiciones entre niveles de energía que dan lugar a los espectros de absorción y de emisión.

### 1.5.3. Ley de Lambert-Beer

A causa de la radiación incidente y la absorbida que se muestra en los espectros mencionados anteriormente, se puede cuantificar la presencia de los compuestos diluidos en la muestra y su concentración. Para ello, es necesario contar con una relación entre la radiación y la concentración, la cual está descrita por la Ley de Lambert-Beer (Skoog et al., 2005, cap. 24).

Esta ley nos da la relación entre la concentración de un analito en disolución y la absorción de radiación de dicho compuesto en la muestra medida. Se debe disponer de una fuente de

## INTRODUCCIÓN

radiación con la que se hace llegar a una muestra un haz de radiación, de longitud de onda previamente seleccionada, cuya potencia es  $P_0$ . La muestra de espesor o paso óptico “b” (en cm), absorbe una parte de esa radiación incidente, de forma que la potencia del haz disminuye después de atravesar la muestra siendo su nueva potencia, P.

El cociente entre la potencia de la radiación que sale de la muestra y la de la que incidió sobre ella, se define como transmitancia:  $T=P/P_0$ . La transmitancia también puede expresarse en tanto por ciento, multiplicando el cociente anterior por 100. Es más frecuente utilizar el concepto de absorbancia (A), que se define como el logaritmo de la transmitancia cambiado de signo:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = -\log T \quad (4)$$

Cuando la concentración y el camino óptico son variables, se obtiene la ecuación de Lambert-Beer:

$$\ln \frac{P_0}{P} = kbC \quad (5)$$

Donde k es una constante de proporcionalidad y C la concentración en  $[\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$ . Esta ley tiene una serie de limitaciones y solamente se cumple para disoluciones uniformes con concentraciones inferiores a  $10^{-2} \text{ M}$  del analito estudiado, con radiación monocromática, y para especies absorbentes que no sufren reacciones químicas con el disolvente (Olsen, 2010; Skoog *et al.*, 2005, cap. 24). No obstante, se hace un uso mayoritario de la siguiente expresión:

$$A = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bC \quad (6)$$

Donde  $\epsilon$  es el coeficiente de absorción molar y viene expresado en  $[\text{L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}]$ . Es una propiedad característica de cada sustancia correspondiente a la cantidad de radiación que absorbe a una longitud de onda determinada por unidad de concentración.

Cuando la radiación incidente ( $P_0$ ) atraviesa la cubeta que tiene la muestra, parte de esta se puede reflejar en las paredes de la celda. De esta manera, P nunca será mayor que  $P_0$ .

Esta relación lineal entre la radiación y la concentración de la muestra está siendo utilizada en el tratamiento de un gran número de espectros. Entre ellos se encuentran los espectros UV y visible que se explicarán con mayor detalle en el siguiente punto.

#### 1.5.4. Espectrofotometría ultravioleta y visible

La espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible (UV-vis) fue uno de los primeros métodos físicos que se aplicó al análisis cuantitativo y a la determinación de estructuras. En la actualidad, supera al resto de métodos ópticos en cuanto al análisis estructural y como técnica auxiliar en elucidación estructural (Olsen, 2010; Skoog *et al.*, 2005, cap. 26).

Las radiaciones ultravioleta y visible tienen en común el que la absorción, en ambas regiones, da lugar a la excitación de electrones a niveles superiores de energía. Para excitar electrones fuertemente unidos se necesitan fotones energéticos (baja longitud de onda), mientras que para excitar electrones lábiles hacen falta fotones con una longitud de onda mayor.

Los datos obtenidos de los espectros de UV-vis contienen mucha información y es necesario darle un adecuado tratamiento para que se pueda transmitir la mayor cantidad posible de esta. Los modelos clásicos lineales han sido y son muy utilizados como herramientas para el tratamiento de este tipo de datos. No obstante, a lo largo de los últimos años, otras herramientas basadas en algoritmos no lineales han ido ocupando un sitio importante en la potente extracción de información útil de estos espectros.

Entre las herramientas no lineales mencionadas, se encuentran los algoritmos inteligentes basados en redes neuronales artificiales que se describen a continuación.

#### 1.5.5. Redes Neuronales Artificiales

La creación de las redes neuronales artificiales (RNAs) se inspiró en el funcionamiento de las neuronas biológicas, y es por lo que recibieron dicho nombre. Su aparición data de los años cuarenta, cuando McCulloch y Pitts en 1943 abrieron una nueva puerta hacia un gran campo de la inteligencia artificial. Desde entonces, las RNAs han ido evolucionado, pero no fue hasta los años ochenta, con el diseño de los primeros perceptrones multicapa (*vide infra*), que el interés y uso de esta tecnología creció exponencialmente y es hoy en día utilizada en una gran variedad de áreas de investigación, tales como la medicina (Shehada *et al.*, 2016), ciencia de los alimentos (Torrecilla *et al.*, 2013-b; Silva *et al.*, 2015), química (Díaz-Rodríguez *et al.*, 2015), bioquímica (Cancilla *et al.*, 2014-a), física (Wierzchos *et al.*, 2015), etc.

Las RNAs son una parte muy importante de la inteligencia artificial computacional, que fue creada para el procesamiento de información y el tratamiento de datos. La fuente de estos

## INTRODUCCIÓN

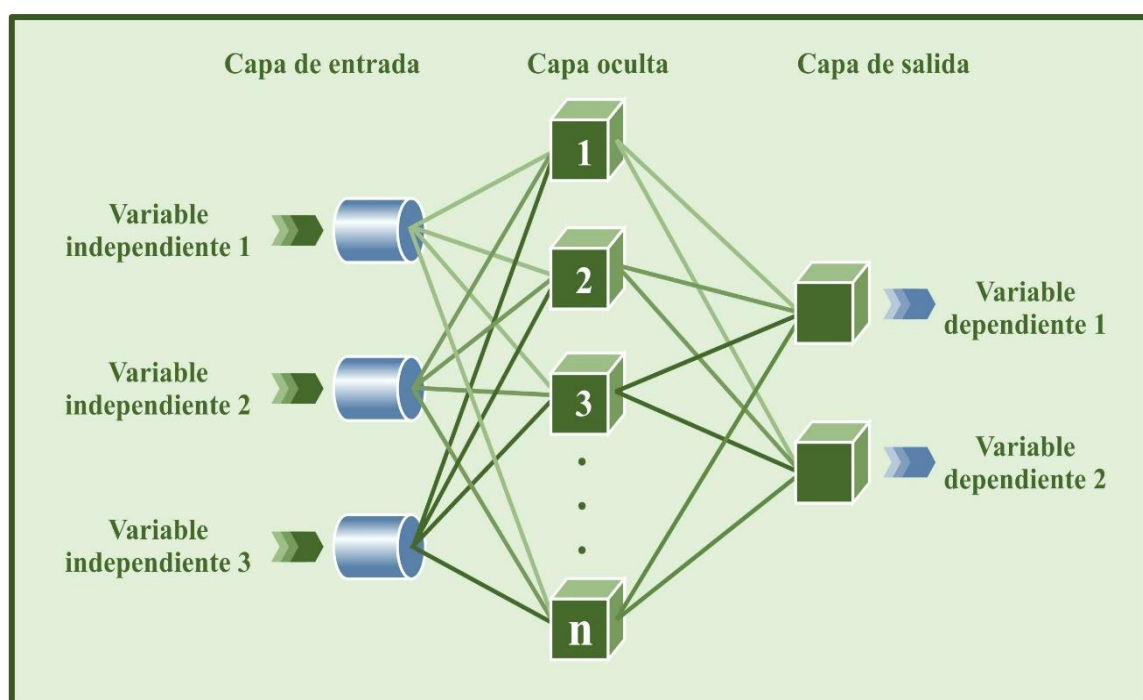
datos puede provenir de espectros como los explicados anteriormente o de imágenes, información cualitativa, etc. La mayor ventaja que presenta este tipo de algoritmos se centra en su capacidad de aprendizaje en continuo, es decir, que estos algoritmos son capaces de “aprender” nuevas situaciones interpoladas en otras que sirvieron para su diseño (Cancilla *et al.*, 2014-b; Torrecilla *et al.*, 2013-a; Torrecilla *et al.*, 2013-b).

Las RNAs son herramientas matemáticas habitualmente más complejas que los modelos clásicos lineales. Por regla general, los resultados que se obtienen presentan una mayor calidad estadística que los algoritmos lineales más clásicos, sobre todo cuando las relaciones entre variables poseen una complejidad elevada. Existen una gran variedad de RNAs que se han venido desarrollando en las últimas décadas. La clasificación más común es la que separa a las RNAs en redes supervisadas y no supervisadas en función de disponer de la variable dependiente o no, respectivamente (Demuth *et al.*, 2007; Torrecilla *et al.*, 2015). Las primeras se utilizan para la modelización de sistemas en el rango de aprendizaje, llevándose a cabo típicamente objetivos de clasificación o estimación (*vide infra*) y las últimas se usan normalmente para clasificar casos de una población, localizándose patrones en las variables independientes para crear subgrupos (o *clusters*) con los datos.

Habitualmente, dentro de las aplicaciones de las RNAs, uno de los usos más comunes es el de encontrar relaciones no lineales entre las variables dependientes e independientes presentes en las bases de datos a analizar. Estos modelos inteligentes se basan en la interpolación no lineal y es por esta razón que es preciso remarcar la gran importancia de trabajar dentro del rango de las variables independientes existentes, usadas en el diseño del algoritmo. Por ello, cualquier extrapolación que se realice con estos algoritmos estará sujeta sin duda a un mayor error estadístico del presentado para el modelo interpolando (Nedic *et al.* 2014).

Como se ha comentado anteriormente, uno de los ejemplos de RNAs más utilizados en muchos campos son los conocidos como perceptrones multicapa (PMC). Los PMCs son un tipo de algoritmo supervisado (Demuth *et al.*, 2007; Cancilla *et al.*, 2014-b). Es decir, estos algoritmos necesitan conocer las variables dependientes para poder diseñar el modelo inteligente y que sea capaz de aprender de los datos que se le suministran (Aroca-Santos *et al.*, 2015; Demuth *et al.*, 2007)

En cuanto a la arquitectura de los PMCs, estos algoritmos tienen una topología compuesta por tres tipos de capas; una **capa de entrada** formada por nodos y encargada exclusivamente de introducir las variables independientes en el modelo, una **capa oculta** y una **capa de salida**, ambas formadas por neuronas artificiales que representan los verdaderos centros de cálculo no lineal (Demuth *et al.*, 2007). Es decir, las neuronas situadas en estas últimas dos capas son el emplazamiento donde se realizan los cálculos y el aprendizaje del modelo y, por tanto, tienen como cometido el tratamiento de los datos y el consiguiente cálculo de las variables dependientes estimadas. En la **figura 15**, se muestra el esquema de un PMC con tres capas (entrada, oculta y de salida). Este esquema representa un modelo que estima dos variables dependientes (dos neuronas de salida) a partir de tres variables independientes (tres nodos de entrada) y  $n$  neuronas ocultas. Entre cada unidad de capas contiguas, aparecen flechas de unión, que están ponderadas por variables llamadas comúnmente pesos de ponderación o simplemente “pesos”. A lo largo de la optimización del modelo, estos pesos van cambiando de valor para otorgar mayor importancia a aquellas variables, y relaciones entre variables, que más influencia tengan sobre el resultado final (Aroca-Santos *et al.*, 2016-a; Aroca-Santos *et al.*, 2016-b; Cancilla *et al.*, 2014-a; Cancilla *et al.*, 2014-b; Torrecilla *et al.*, 2015).



**Figura 15.** Esquema de un perceptrón multicapa (líneas verdes representan los pesos). Este ejemplo estima dos variables de salida (variables dependientes) a partir de tres variables de entrada (variables independientes).

## INTRODUCCIÓN

El número de neuronas de la capa de salida coincide con el número de variables dependientes del modelo matemático. Sin embargo, el número de neuronas ocultas (NNO) es un parámetro que debe ser optimizado para garantizar el buen funcionamiento del modelo basado en el PMC, ya que un gran número de NNO puede llevar a los modelos que solo funcionen adecuadamente con los datos que han sido utilizados para su entrenamiento (modelo sobreajustado o “traje a medida”), y por tanto no podrían generalizar, es decir, evaluar correctamente otras bases de datos, aunque estas estuvieran interpoladas en la base de datos de entrenamiento. Por otro lado, si el NNO es muy pequeño, el modelo no tendría la capacidad necesaria para describir adecuadamente la población completa.

Dentro de la gran variedad de RNAs existentes, se ha seleccionado los modelos basados en PMCs como algoritmos supervisados para el control de calidad en el sector alimentario en esta Tesis Doctoral, ya que en los últimos años estos algoritmos han demostrado su fiabilidad en distintos campos tecnológicos y científicos, como por ejemplo, en bioquímica (Cancilla *et al.*, 2014-a), agricultura (Qian *et al.*, 2018), tecnología de los alimentos (Torrecilla *et al.*, 2016-a; Torrecilla *et al.*, 2016-b) y también fundamentalmente en aplicaciones relacionadas con el sector *ul.*, 2018; Aroca-Santos *et al.*, 2015; Torrecilla *et al.*, 2015).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se describirán tanto los aceites utilizados para los distintos experimentos que se llevaron a cabo, como la técnica analítica empleada. Asimismo, se presentarán los procedimientos matemáticos usados en el tratamiento de datos y el diseño de los modelos estimativos lineales y no lineales.

### 2.1. Aceites utilizados

A lo largo de esta investigación, se utilizaron un gran número de muestras de aceite de oliva virgen extra (AOVE) de diversas variedades de olivo, algunos con denominación de origen protegida y aceites refinados de oliva y orujo, además de muestras de otros aceites vegetales (maíz, girasol, soja y almendra), dentro y fuera de su fecha de consumo preferente. Todos estos aceites empleados en la preparación de las muestras fueron comprados en centros comerciales y almacenados a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su apertura.

Con el objetivo de la estimación de la calidad de los AOVE se midieron muestras puras, mezclas binarias y también ternarias de dichos aceites según cada experimento. En las **tablas 7 y 8** se muestran las principales características comerciales de los aceites adquiridos.

Durante la preparación de las muestras no se utilizó ningún disolvente. No fue necesaria la extracción de ningún analito ni molécula concreta. El procedimiento de preparación de mezclas consistió fundamentalmente en combinar cantidades establecidas en peso de los aceites integrantes de las mezclas. Posteriormente, se agitaron suavemente las mezclas durante cinco minutos y se colocaron en una cubeta de cuarzo para su posterior análisis espectroscópico.



**Tabla 7.** Principales características comerciales de los AOVE utilizados.

Proveedor	Variedad	Denominación de Origen Protegida (DOP)
Borges Pont S.A.U.	Picual	-
Borges Pont S.A.U.	Arbequina	-
Borges Pont S.A.U.	Hojiblanca	-
Aceites Toledo, S.A.	Cornicabra	-
Aceites Siurana	Arbequina	Siurana, Tarragona
Almazara del Ebro	Empeltre	-
As Pontis	Manzanilla Cacereña	-
Castillo de Tabernas	Picual	-
Marqués de Griñón	Arbequina	-
Enclaves D. Oro	Cornicabra	Montes de Toledo, Toledo

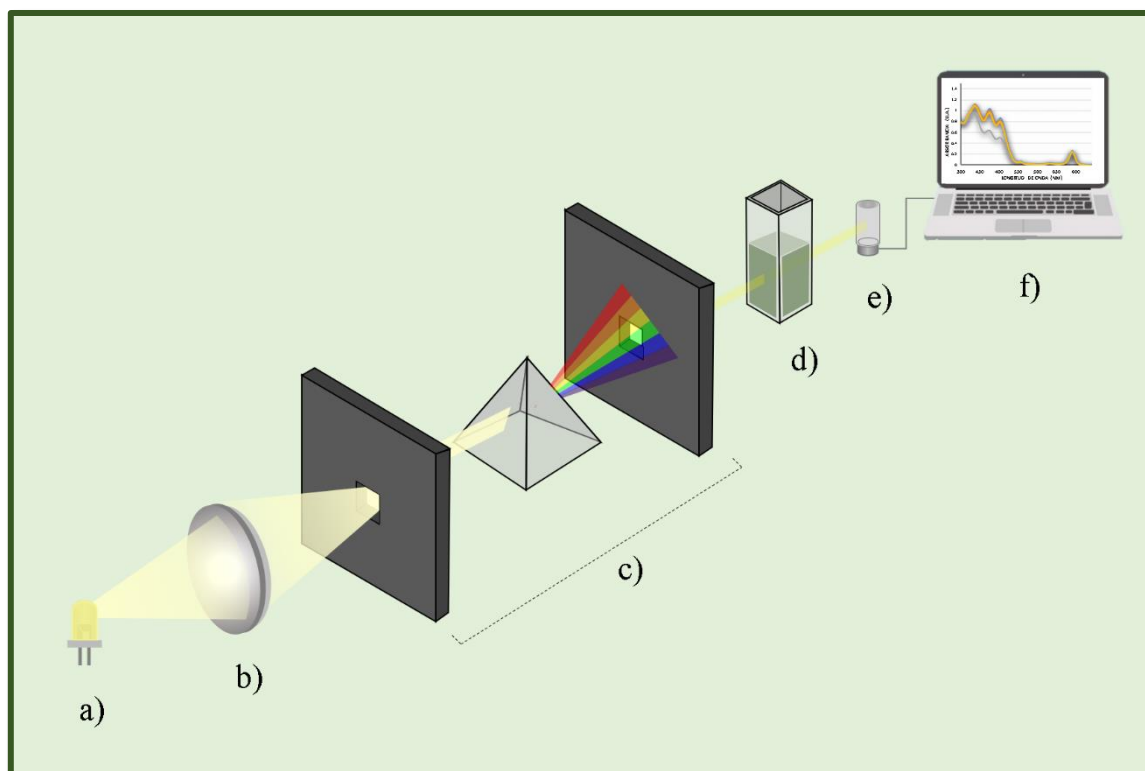
**Tabla 8.** Principales características comerciales de los aceites vegetales, de oliva refinado y de orujo refinado utilizados como adulterantes.

Proveedor	Aceite
Koipe, SOS Cuétara S.A.	Maíz Refinado
Koipe, SOS Cuétara S.A.	Girasol Refinado
Koipe, SOS Cuétara S.A.	Aceite de Oliva Refinado
DÍA (Marca blanca)	Aceite de Orujo Refinado
Laboratorios Manuel Riesgo	Soja Refinado
Laboratorios Manuel Riesgo	Almendra Refinado

## 2.2. Espectrofotometría UV-visible

La espectrofotometría de UV-visible es una técnica muy utilizada en el análisis de alimentos (Torrecilla *et al.*, 2013-b; Torrecilla *et al.*, 2015; Torrecilla *et al.*, 2016-a; Aroca-Santos *et al.*, 2015; Sen y Tokatli, 2016; Forina *et al.*, 2015; Ulloa *et al.*, 2013; Alamprese *et al.*, 2013; Biancolillo *et al.*, 2014; Boggia *et al.*, 2013) que se basa en la medida de la absorción de la luz a ciertas longitudes de onda, coherentes con la zona del espectro UV y visible, por moléculas pertenecientes a la muestra líquida que esté siendo medida. En general, este instrumento consta

de seis partes fundamentales representadas en la **figura 16**, que son: fuente de luz necesaria para la excitación de las muestras (a), una lente colimadora (b), un monocromador (c), un compartimento para colocar la cubeta con muestra (d), un detector (e) y finalmente un ordenador (f) para poder ver la señal o espectro de la muestra, recogido por el detector (Skoog *et al.*, 2005, cap. 25).

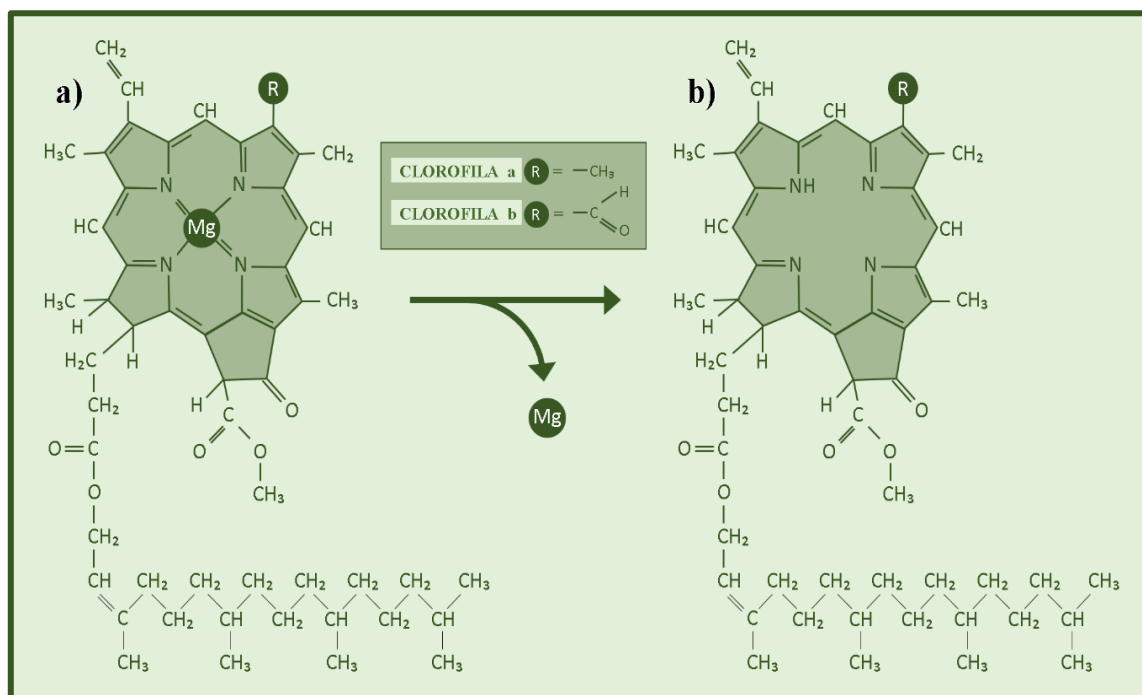


**Figura 16.** Esquema de los componentes principales de un espectrofotómetro. (a) Fuente de luz; (b) lente colimadora; (c) monocromador; (d) compartimento para colocar la cubeta con muestra; (e) detector; (f) un ordenador.

Dentro de los dispositivos existentes para medir la absorción en este rango del espectro electromagnético, se ha utilizado un espectrofotómetro de UV-vis modelo Varian Cary-1E para medir los aceites y sus mezclas. La cubeta (Hellma Analytics, Alemania) seleccionada para hacer las medidas cuenta con un paso óptico de un centímetro de longitud y únicamente dos caras transparentes para permitir la entrada y salida del haz de luz.

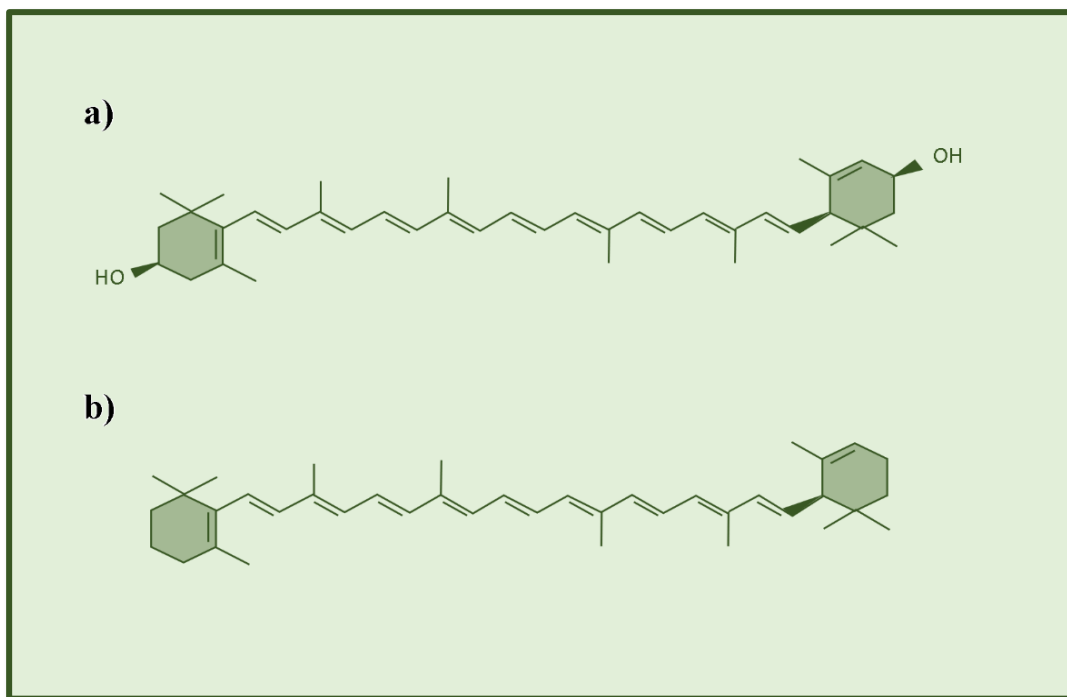
En concreto, lo que se obtuvo de los aceites analizados con esta técnica fue la absorción, en la zona visible del espectro (entre 400 y 700 nm de longitud de onda), de las moléculas de pigmentos (clorofilas y carotenos, entre otros), pertenecientes a la fracción insaponificable de los aceites de oliva (*vide supra*). La posible detección de dichos pigmentos, mediante sus espectros de absorción, es una forma fiable de ayudar en el control de calidad de los AOVE,

debido a la sensibilidad de estas moléculas frente a factores tales como la luz, el oxígeno y la temperatura (Gandul-Rojas *et al.*, 2016; Lazzerini *et al.*, 2017). Las clorofilas dentro de los AOVE, se encuentran mayormente en forma de feofitinas. Estos compuestos se forman tras la degradación, mediante la pérdida del átomo de magnesio, de las clorofilas, como se muestra en la **figura 17**.

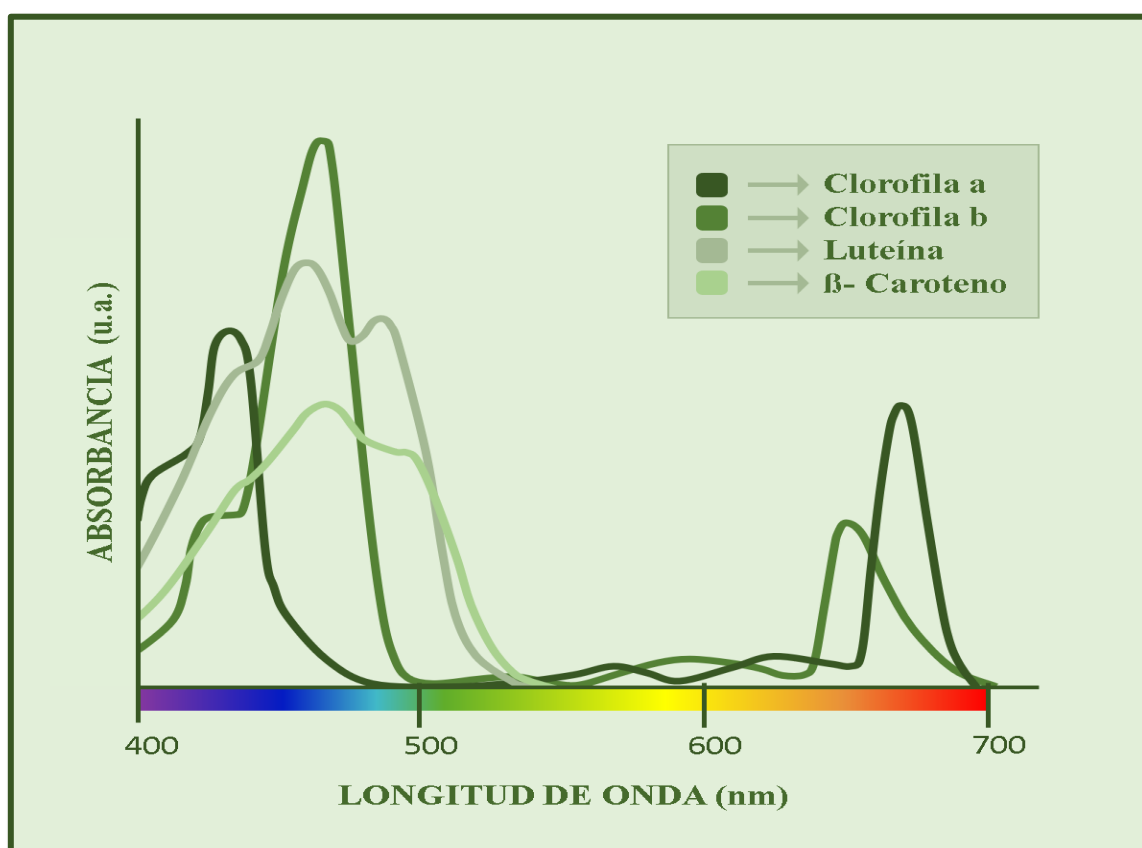


**Figura 17.** Esquema de la degradación de la clorofila para originar feofitina.

Los carotenoides más abundantes en los AOVE son la luteína y el  $\beta$ -caroteno, representados en la **figura 18**. Las clorofilas y sus derivados presentan dos zonas de absorción en el espectro visible, que son entre 400 y 500 nm y entre 600 y 700 nm, mientras que los carotenoides estudiados únicamente absorben entre 400 y 500 nm (Lazzerini *et al.*, 2016) (**figura 19**). Con la información de los espectros de absorción y la ley de Lambert-Beer (*vide supra*), es posible conocer las concentraciones relativas de estos compuestos para poder evaluar la calidad de los AOVE.



**Figura 18.** Representación de las moléculas de: a) Luteína y b)  $\beta$ -caroteno.



**Figura 19.** Espectros de absorción en la zona del visible de los pigmentos más representativos de los AOVE.

### 2.3. Redes neuronales artificiales

Las redes neuronales artificiales son herramientas matemáticas muy útiles para trabajar con grandes bases de datos y, como se mencionó en la introducción, son capaces de hallar relaciones no lineales entre las variables independientes y dependientes. Asimismo, estos algoritmos suelen ofrecer mejores resultados que los métodos lineales clásicos al modelizar relaciones complejas entre variables.

Entre la gran cantidad de tipos de modelos inteligentes, para la realización de este trabajo se escogió la validación del perceptrón multicapa. Dicha herramienta es de naturaleza supervisada (*vide supra*) lo cual quiere decir que se necesitan tanto los datos de entrada (“*inputs*”), que son las variables independientes, como las variables de salida (“*outputs*”) o variables dependientes. Estos algoritmos requieren un alto número de datos para ser entrenados adecuadamente.

Para que sea posible obtener una herramienta de estimación fiable, funcional y precisa, es necesario llevar a cabo una serie de pasos previos para que estas redes neuronales ofrezcan resultados satisfactorios. Lo primero, como en todos los casos, independientemente de la naturaleza de los modelos, es analizar estadísticamente los datos a tratar. Esto se hace con el objetivo de verificar si los datos describen adecuadamente la población que está siendo estudiada.

Tras la confirmación de la valía de los datos, comienza el diseño del PMC. Primero se reordenan aleatoriamente los datos para formar subgrupos llamados datos de entrenamiento (o aprendizaje), verificación y validación. La muestra de aprendizaje cuenta aproximadamente con el 70% de la base de datos, la de verificación con el 20% y, finalmente, la de validación con el 10% restante. Es importante que los datos de verificación y validación estén interpolados en los de aprendizaje, ya que los PMCs son herramientas que dan errores elevados al ser forzadas a extrapolar (*vide supra*). La muestra de aprendizaje se utiliza exclusivamente para la optimación del modelo (modificación de los pesos) y todos los parámetros. Por otro lado, los datos de verificación actúan como un control interno de esta modificación de los pesos, asegurando que estos cambios sirvan para estimar correctamente datos no usados durante el entrenamiento, evitando así los modelos sobreajustados. Una vez optimado el modelo, la muestra restante, que es la de validación (puede entenderse como muestras ciegas), se utiliza únicamente para testar el modelo y comprobar si realmente responde a las especificaciones fijadas inicialmente. A

continuación, se muestran en detalle todos estos pasos incluyendo la optimación y selección de cada uno de los parámetros del modelo inteligente.

Para llevar a cabo todos los cálculos relativos a las redes neuronales se utilizó el software MATLAB v7.0.1 (Beale *et al.*, 2018).

El proceso de optimación de los modelos se hizo teniendo en cuenta los errores de estimación, definidos como la diferencia entre los valores de salida de los modelos matemáticos y los valores reales de las variables dependientes. Las distintas formas de error de estimación están definidas como el error absoluto medio (EAM) o el error porcentual medio (EPM), **ecuaciones 7 y 8**, respectivamente.

$$EAM = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N |r_k - y_k| \quad (7)$$

$$EPM = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \frac{|r_k - y_k|}{r_k} \times 100 \quad (8)$$

Donde  $N$  representa al número de datos evaluados,  $r_k$  es el valor real, e  $y_k$  es el valor estimado por el modelo.

### 2.3.1. Entrenamiento general de la red neuronal

Esta etapa es la parte fundamental de cualquier modelo inteligente basado en PMCs puesto que, durante ella, se optiman los pesos de las conexiones entre nodos y neuronas (**figura 15**). Para llevar a cabo este proceso de entrenamiento, se requieren datos de entrada y salida normalizados entre 0 y 1 (*vide infra*), teniendo en cuenta los algoritmos usados. Además, es necesario fijar diversos parámetros, entre los que están el número de neuronas ocultas (NNO), coeficiente de aprendizaje ( $L_c$ ) y los coeficientes de aprendizaje de disminución ( $L_{cd}$ ) e incremento ( $L_{ci}$ ) (*vide infra*).

En primer lugar, se presentan al modelo todos los valores de entrada y salida de los datos pertenecientes al conjunto de aprendizaje. Una vez analizados todos los valores de la muestra de aprendizaje, y evaluado el error obtenido, se habrá llevado a cabo un ciclo de entrenamiento. Los pesos utilizados inicialmente en este proceso, si no han sido establecidos previamente, son seleccionados aleatoriamente entre 0 y 1 por el propio sistema, y tras evaluar dichos errores de entrenamiento, los pesos se modifican para disminuir este error, y acercarse por primera vez a sus valores óptimos. Una vez finalizado el primer ciclo, se presenta la muestra de verificación

obteniendo de esta forma un error de estimación para datos no empleados durante la modificación de los pesos. Este segundo error de estimación (o error de estimación de verificación) se emplea para comprobar la evolución del aprendizaje y la habilidad de la herramienta para operar con datos externos al entrenamiento. Finalizado este primer ciclo, comienza el segundo de la misma forma obteniendo otros dos errores de estimación (de entrenamiento y verificación) y repitiendo tanto la optimación de los pesos como el control de la evolución del aprendizaje. El aprendizaje finaliza una vez que los errores de estimación de verificación aumentan durante un intervalo de cinco ciclos.

La optimación de los pesos ofrece dos resultados importantes; los pesos óptimos (objetivo fundamental del proceso de optimación) y las variables y conexiones más importantes en el cumplimiento de las especificaciones requeridas. La finalización del proceso de aprendizaje permite prevenir la presencia del mencionado sobreajuste u “*overfitting*”, alcanzándose una herramienta capaz de generalizar para datos externos.

Se debe tener en cuenta que, si se inicia el proceso de optimación con otras condiciones de operación o con otros datos, es necesario comenzar todo el proceso de aprendizaje y verificación. Es decir, para cualquier proceso de optimación de parámetros donde se tengan que testar las distintas condiciones de operación de un diseño de experimentos, es preciso establecer siempre un estado inicial común e iniciar el proceso de optimación en todos los casos del diseño con el fin de poder comparar los resultados adecuadamente.

Una vez que los procesos de optimación de pesos y verificación han llegado a su fin, y se cumplen las especificaciones requeridas para el modelo con respecto a la muestra de verificación, se procede al proceso de validación.

Si los resultados estadísticos conseguidos con la muestra de validación (datos completamente externos al proceso de entrenamiento, separados inicialmente y al azar de la base de datos antes de implementar el PMC) cumplen con los requisitos establecidos, se puede dar por terminado el diseño del modelo matemático.

### 2.3.2. Optimización del perceptrón multicapa

Además de los pesos, hay una serie de parámetros que también se deben optimizar o seleccionar durante el diseño de un PMC. Estos son fundamentalmente el NNO, función de entrenamiento, función de transferencia,  $L_c$ ,  $L_{cd}$ , y  $L_{ci}$ .

En cuanto al número de neuronas en la capa oculta del modelo (**figura 15**), es importante destacar que este número afecta a la calidad estimativa del modelo, y es por lo que debe controlarse y optimarse cuidadosamente. Si se utilizan demasiadas neuronas ocultas se puede producir un sobreajuste (*vide supra*) del modelo, mientras que, por el contrario, si se usa un número insuficiente de neuronas puede disminuir la capacidad de aprendizaje del modelo. El modo de optimizar este valor es por medio de un diseño de experimentos (*vide infra*), donde el NNO máximo sea tal, que el número de pesos del modelo (**ecuación 9**) no supere la tercera parte del número de datos de la muestra de aprendizaje.

$$P = (NNO \times E) + (NNO \times S) + (Bias \times NNO) \quad (9)$$

Donde P representa el número de pesos, E el número de variables independientes (capa de entrada), S el número de variables dependientes (capa de salida) y Bias el número de neuronas Bias ocultas de la red (Demuth *et al.*, 2007).

Por otro lado, las funciones de transferencia y entrenamiento se encargan de la normalización de la salida de los resultados de cada neurona del PMC y de la optimación de los pesos del modelo, respectivamente. La función de transferencia utilizada en los modelos testados está basada en la función sigmoidea, cuyo valor de salida se encuentra comprendido entre 0 y 1. Esta función fue seleccionada frente a otras funciones como la tangente hiperbólica (comprendida entre -1 y 1) porque en algunos de los casos testados, el valor de las variables independientes se encuentra limitado en este intervalo desde el propio equipo analítico y también porque la función sigmoidea es de las que ofrecen mejores resultados en la modelización de sistemas con características similares (Torrecilla *et al.*, 2007). El rango de esta función, es el motivo por el cual los datos deben ser linealmente normalizados entre 0 y 1, antes de comenzar el proceso de aprendizaje. En cuanto a la función de entrenamiento, se han empleado las funciones de entrenamiento denominadas “*Bayesian-regularization back-propagation*” (trainBR) y “*Levenberg–Marquardt back-propagation*” (trainLM). Ambas funciones optiman los pesos de acuerdo con el algoritmo Levenberg–Marquardt (L-M)



(Demuth *et al.*, 2007). La única diferencia entre ellas es que en la primera se tiene en cuenta el error de estimación y el valor de los pesos y en la otra solo se considera el valor del error de estimación.

La función L-M es un algoritmo de optimación aplicada a funciones habitualmente no lineales. Son funciones notablemente más robustas que otros algoritmos clásicos basados en las ecuaciones de Gauss-Newton. Dichas ecuaciones se emplean en la resolución de problemas no lineales de mínimos cuadrados como método de optimación matemática. A la hora de usar una función de entrenamiento u otra (trainLM o trainBR), se debe tener en cuenta el tiempo disponible para la realización de la optimación del modelo, los recursos con los que se cuenta y aquellos que son requeridos por la propia función matemática. En este contexto, dado que la trainBR requiere de más recursos de cálculo, habitualmente resulta en un aprendizaje más lento que el de la función trainLM (Demuth *et al.*, 2007).

En cuanto a los coeficientes de aprendizaje  $L_c$ ,  $L_{cd}$  y  $L_{ci}$ , influyen en la fase de optimización de los pesos del modelo.  $L_c$  es semejante al coeficiente “h” en el método de Newton aplicado para el cálculo de las raíces de un polinomio.  $L_{cd}$  y  $L_{ci}$  son coeficientes que permiten el incremento o decremento de  $L_c$  en caso de que el error de estimación aumente o disminuya respectivamente. Dada la variación simultánea que tienen estos tres coeficientes, su optimación se realiza por medio de un diseño de experimentos. El intervalo de estos coeficientes se encuentra situado, en el caso de  $L_c$  y  $L_{cd}$ , entre 0,001 hasta 1, mientras que  $L_{ci}$  se encuentra limitado entre 2 y 100 (Cancilla *et al.*, 2014-a; Cancilla *et al.*, 2014-b; Torrecilla *et al.*, 2015).

Dada la influencia que tienen entre sí las variables estudiadas hasta el momento (NNO,  $L_c$ ,  $L_{cd}$  y  $L_{ci}$ ) sobre el error de estimación del modelo, se debe de realizar una optimación global de todas ellas a la vez, y para ello se lleva a cabo un diseño de experimentos basado en el “*Box-Wilson Central Composite Design 2<sup>4</sup> + star points*” (Cancilla *et al.*, 2014-a; Torrecilla *et al.*, 2016-a; Aroca-Santos *et al.*, 2015).

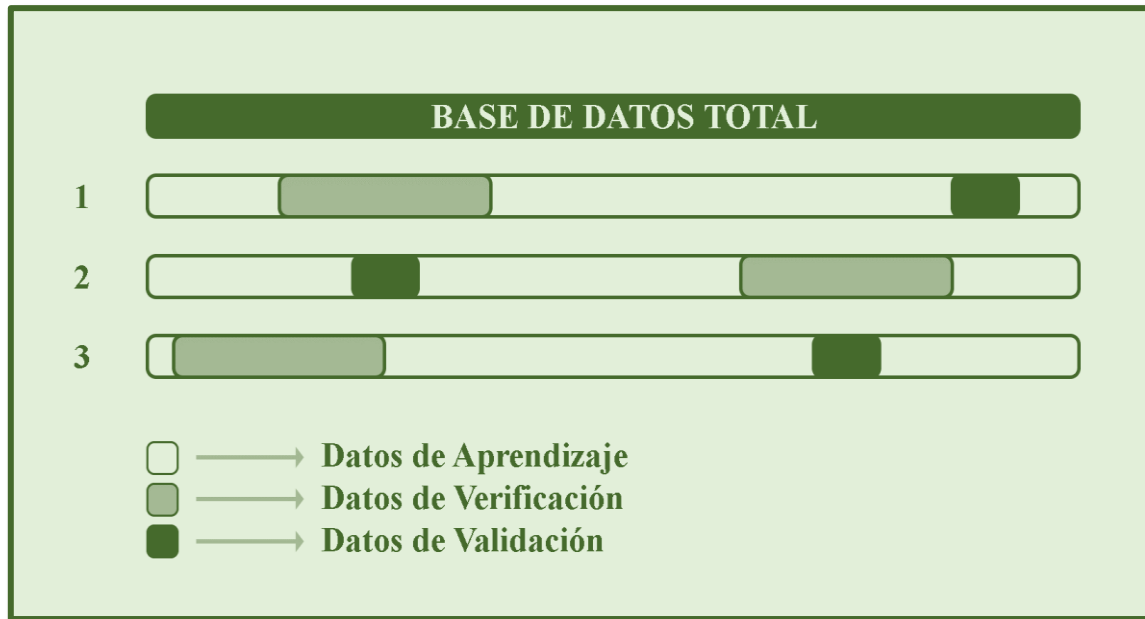
Una vez optimadas las variables estudiadas y establecidas las funciones como se mencionó anteriormente, es necesario hacer una última optimación de los pesos del modelo ya optimado. Esta optimación final tiene como objetivo, no solo alcanzar los pesos óptimos sino también verificar si la resolución del diseño de experimentos ha resultado en un modelo que cumple con las especificaciones esperadas. Para conseguir esto, primero se revisa el modelo con la muestra de verificación y después se lleva a cabo el proceso de validación con la muestra de validación.

### 2.3.3. Validación del perceptrón multicapa

Una vez que se han conseguido todos los parámetros óptimos para el correcto funcionamiento de la red diseñada, es necesario comprobar que pueda generar buenos resultados, es decir, que sea capaz de estimar/generalizar apropiadamente a la hora de presentarle nuevos datos, y esto se consigue con el proceso de validación. Este consiste en calcular, por medio del modelo a validar, el valor de las variables dependientes correspondientes a la muestra de validación.

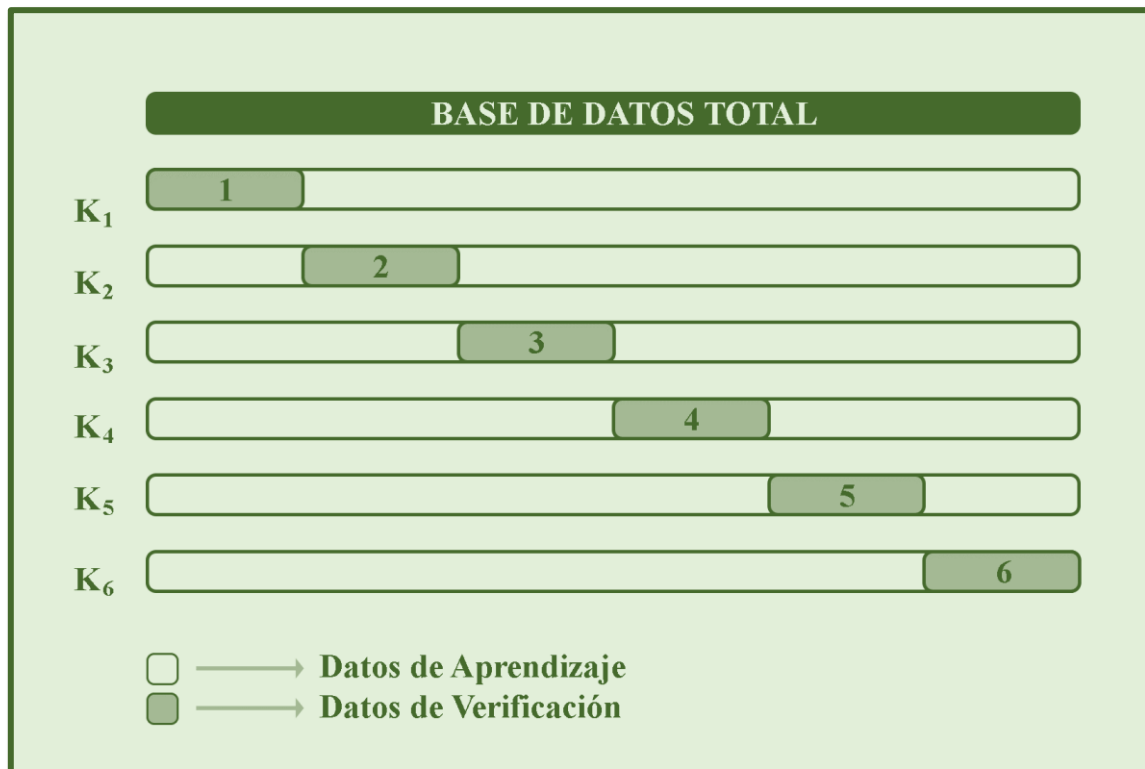
Se habla de validación interna o externa según la procedencia de los datos necesarios para llevar a cabo la validación. En este apartado se describe únicamente la interna debido a que es la empleada en este trabajo. Cuando se habla de validación interna, se refiere a que los datos utilizados para validar el modelo pertenecen a la base de datos con la que se ha diseñado la red pero que en ningún momento han sido utilizados para el diseño de esta (ni siquiera para parar el aprendizaje como en el caso de la muestra de verificación). En este caso, un 10% aleatorio de las muestras de las bases de datos originales se “apartan” del proceso de diseño y optimación del modelo matemático para usarse posteriormente como validación interna.

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron dos tipos de validación interna; la validación interna simple y la validación cruzada. La validación interna simple consiste en dividir aleatoriamente toda la base de datos en tres partes; aprendizaje, verificación y validación siendo un 70, 20 y 10% de la base de datos completa, respectivamente (Aroca-Santos *et al.*, 2015; Torrecilla *et al.*, 2016-a; Torrecilla *et al.*, 2016-b). Este proceso de aleatorización se lleva a cabo tres veces, como se muestra en la **figura 20**, y en cada caso se obtiene un error de estimación en la muestra de validación y el valor final es la media de los tres.



**Figura 20.** Esquema de una validación interna simple con tres pruebas, donde cada bloque representa la base de datos total dividida en tres muestras: aprendizaje, verificación y validación.

Por otro lado, la validación cruzada, también conocida como “*k-fold cross-validation*”, se fundamenta en dividir toda la base de datos en  $k$  conjuntos y utilizar cada uno de ellos secuencialmente como datos de validación, como se puede ver en la **figura 21**. De esta forma todos los datos del modelo son al menos una vez parte del conjunto de validación del modelo. El número de  $k$  para las redes diseñadas en este trabajo es seis. Durante el proceso de validación se obtiene un error para cada  $k$  y, por tanto, para conseguir el error global del modelo se hace un promedio de los seis errores de estimación para conocer la fiabilidad del modelo diseñado a lo largo de todo el intervalo de la base de datos (Torrecilla *et al.*, 2016-a; Torrecilla *et al.*, 2016-b; Cancilla *et al.*, 2014-a; Cancilla *et al.*, 2014-b).



**Figura 21.** Esquema de una validación cruzada ( $k = 6$ ), donde cada bloque representa la base de datos total dividida en datos de aprendizaje y verificación.



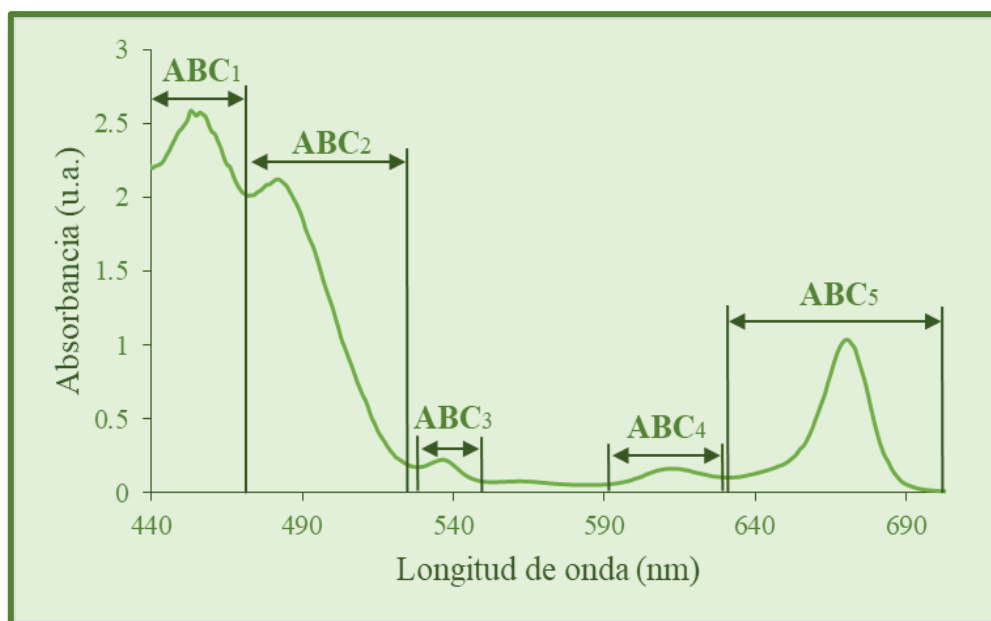
### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan los resultados principales de este trabajo organizados en tres partes: (i) los resultados procedentes de los espectros de absorción para el análisis de calidad del aceite de oliva virgen extra (AOVE); (ii) el papel que juegan los algoritmos inteligentes en el tratamiento de datos dentro del sector oleícola; (iii) la aplicación conjunta de la técnica espectroscópica mencionada y los algoritmos inteligentes en la solución de problemáticas comunes del sector oleícola.

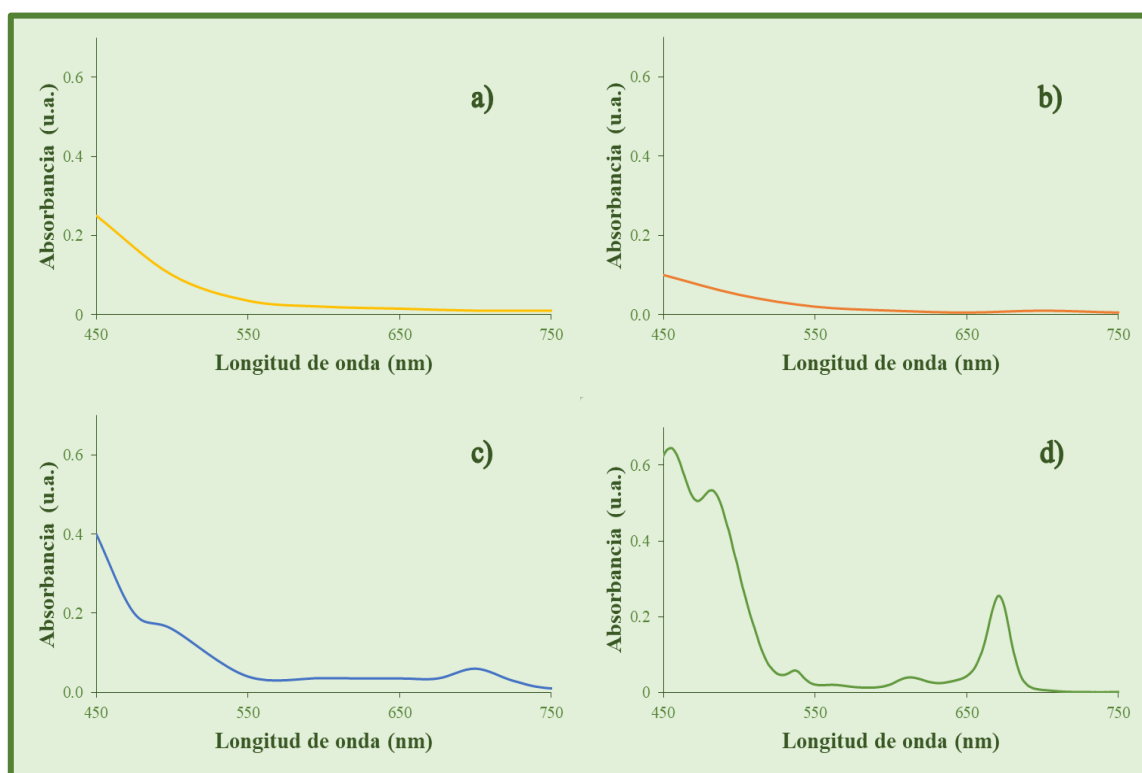
#### 3.1. Espectrofotometría UV-vis en la detección de adulterantes en el AOVE

Antes de desarrollar ningún algoritmo inteligente es necesario determinar la potencialidad que presenta la espectrofotometría UV-vis para describir adecuadamente la calidad de los AOVE con ningún tratamiento previo de la muestra. Con el objetivo de detectar adulterantes en el AOVE utilizando esta técnica espectroscópica, se escogió un AOVE de variedad Picual (Borges Pont SAU), que es un tipo de aceituna muy común en España. Asimismo, como adulterantes se emplearon diversos aceites de oliva de menor calidad (aceite de oliva refinado, aceite de oliva de orujo) y aceites vegetales como el aceite de girasol y el aceite de maíz, **tablas 7 y 8**.

Antes de proceder a las adulteraciones, se midieron los espectros visibles de cada uno de los aceites puros, con el espectrofotómetro operando entre 400 y 750 nm (**figuras 22 y 23**). En estas figuras se observa que, entre 400 y 500 nm, los cinco aceites presentan bandas de absorción correspondientes a las clorofilas y los carotenos, mientras que, entre 600 y 700 nm, solo absorben significativamente los aceites que provienen de la aceituna (AOVE, refinado y orujo), gracias a las clorofilas y feofitinas que absorbe en esa región ([Lazzerini \*et al.\*, 2016](#)). Como era de esperar, los espectros más parecidos entre sí fueron los del AOVE y el aceite refinado, ya que provienen del mismo fruto y absorben en las mismas longitudes de onda.



**Figura 22.** Espectro de absorción del AOVE variedad Picual (Borges Pont SAU) y rangos de las ABCs utilizadas como variables independientes.



**Figura 23.** Espectros de absorción de los cuatro adulterantes. (a) Aceite de maíz, (b) aceite de girasol, (c) aceite de orujo refinado y (d) aceite de oliva refinado.

Para la detección de los adulterantes, se prepararon 20 muestras del AOVE con concentraciones conocidas de cada uno de los adulterantes, haciendo un total de 80 mezclas binarias. El porcentaje de adulterante en las mezclas binarias, variaba entre el 1 y el 20% en peso.

Para llevar a cabo el tratamiento matemático de los datos, se calcularon las áreas bajo la curva (ABCs) de las 5 bandas más representativas de los espectros, siendo  $ABC_1$  de 440-472 nm,  $ABC_2$  de 473-526 nm,  $ABC_3$  de 529-551 nm,  $ABC_4$  de 593-630 nm y  $ABC_5$  de 632-703 nm. Estas áreas fueron utilizadas como variables independientes para la creación de cinco ecuaciones de regresión lineal por mínimos cuadrados (**ecuación 10**), basadas en buscar una relación lineal entre las variables independientes y las dependientes. Para estos modelos se hizo uso del software Statgraphics Centurion XVI. De las cinco ecuaciones, una de ellas se usó para estimar el contenido de AOVE en las mezclas binarias, y las restantes para determinar el tipo de adulterante.

$$[AOVE] = C + \sum_{i=1} a_i \times ABC_i + \varepsilon \quad (10)$$

Donde  $[AOVE]$  es la concentración de AOVE (variable dependiente),  $C$  es la constante del modelo,  $a_i$  es el coeficiente de regresión de las variables independientes,  $ABC_i$  representa las variables independientes y  $\varepsilon$  es el error aleatorio.

Las cinco ecuaciones se validaron como un único modelo lineal mediante tres validaciones internas y los resultados medios obtenidos fueron una tasa de identificación de adulterante del 87,5% de aciertos y un error porcentual medio en la concentración de AOVE de 1,5% (Aroca-Santos *et al.*, 2015).

Una vez más queda patente que la espectrofotometría UV-vis es un método barato, rápido y fiable para el control de calidad de los alimentos testados. Sin embargo, los resultados estadísticos obtenidos por medio de los modelos lineales no son destacables y deben de ser mejorados con el objetivo de incrementar la fiabilidad de las herramientas para hacerlas más competitivas. No obstante, el objetivo de este apartado queda cumplido ya que se demuestra que la técnica espectroscópica basada en absorción visible es adecuada para el control de calidad de los AOVE al poderse identificar y cuantificar adulterantes.



### 3.2. Aplicación del perceptrón multicapa

La herramienta inteligente empleada para testar la mejora del tratamiento de los datos en la detección de adulterantes y control de calidad del AOVE son los perceptrones multicapa (PMCs). Estos algoritmos fueron escogidos como herramienta matemática no lineal, por su demostrado éxito en publicaciones científicas del sector alimenticio (*vide supra*).

Como continuación del apartado anterior, se sustituyen los algoritmos lineales por algoritmos basados en PMCs. En este caso, se emplean los mismos datos mencionados anteriormente, es decir, los espectros de las 80 mezclas binarias del AOVE de variedad Picual con los cuatro aceites de menor calidad (aceites de oliva refinado, orujo refinado, maíz y girasol).

En esta ocasión, se diseñaron dos modelos en función de las variables independientes utilizadas. El primer modelo se realizó utilizando las mismas cinco ABCs (**figura 22**) de los modelos lineales del apartado anterior y para el segundo modelo se emplearon los máximos de absorción de los cinco picos correspondientes a las siguientes longitudes de onda: 456, 483, 536, 612 y 670 nm. De esta forma, se puede comparar el comportamiento de los modelos lineales y no lineales, utilizando la misma información, en el primer caso, y, por otro lado, dado que se prueban otras variables independientes, también es posible seleccionar la información de entrada más relevante en la detección de adulteraciones en el AOVE.

Por tanto, se diseñaron dos modelos inteligentes con distintas variables independientes para posteriormente comparar sus resultados con los de los modelos lineales. Estas comparaciones se llevaron a cabo en función de la tasa de identificación de adulterante y del error porcentual medio (EPM) de la estimación del porcentaje de AOVE en peso en las mezclas binarias. La tasa de identificación se refiere al porcentaje de acierto con el cual el modelo es capaz de identificar el adulterante presente en las muestras. En la **tabla 9**, se muestra que los modelos no lineales que dan mejores resultados son los que usan las ABCs como variables independientes. Con estas variables independientes no hay ningún error de identificación del adulterante y el error de estimación (EPM) de la concentración es menos de la mitad cuando se compara con el modelo que usa valores de absorbancia a longitudes de onda estrictas (absorbancia en los máximos). Por otro lado, si comparamos estos resultados con los obtenidos con modelos lineales utilizando las mismas variables independientes, la tasa de identificación asciende hasta el 100% y el error de estimación desciende hasta un 0.6% (1,5% para el modelo

lineal). Por tanto, se observa una mejora notable tras cambiar el algoritmo lineal por un modelo inteligente basado en redes neuronales.

**Tabla 9.** Comparación de los resultados obtenidos por la red según las variables independientes utilizadas en la capa de entrada.

Parámetro	Variables independientes	Tasa de identificación (%)	EPM del porcentaje en volumen de AOVE (%)
Datos de entrada	Abs <sub>max</sub>	83	1,3
	ABC	100	0,6

Debido a que el modelo que mejores resultados estadísticos presenta es aquel que fue diseñado utilizando las ABCs como variables independientes, este fue el que se optimizó al completo (**tabla 10**).

**Tabla 10.** Parámetros optimizados del modelo no lineal basado en el PMC, utilizando como variables independientes las cinco áreas bajo la curva.

Parámetros seleccionados u optimizados	
Función de transferencia	Sigmoide
Función de entrenamiento	TrainLM
Número de neuronas ocultas	5
L <sub>c</sub>	0,51
L <sub>cd</sub>	0,002
L <sub>ci</sub>	98

Una vez creado y optimizado el modelo, se validó mediante tres validaciones internas simples para poder compararse con el modelo lineal mencionado anteriormente. Los resultados de ambos modelos se muestran en la **tabla 11**.

**Tabla 11.** Resultados de la validación interna de los modelos no lineales basados en el PMC y el modelo lineal de regresión de mínimos cuadrados (RMC).

Modelo matemático	Tasa de identificación (%)	EPM del porcentaje en volumen de AOVE (%)
RMC	87,5	1,5
PMC	95,8	1,2

En esta tabla se muestra la mejora de los resultados estadísticos cuando se utilizan modelos basados en PMCs. Con estos modelos, tanto la identificación de los adulterantes como la estimación de sus concentraciones se obtienen con errores inferiores a los de los modelos lineales.

### **3.3. Espectrofotometría UV-vis combinada con redes neuronales para el análisis del aceite de oliva virgen extra**

En vista de los resultados obtenidos, se puede afirmar que la espectroscopia de absorción en la zona del visible es adecuada para el control de calidad de los AOVEs y que la aplicación de algoritmos inteligentes como herramienta quimicométrica mejora notablemente los resultados obtenidos por medio de modelos lineales clásicos. Es decir, lo cotejado hasta el momento apoya la hipótesis de que los algoritmos inteligentes son adecuados para el diseño de sensores aptos para el control de calidad de los AOVE con datos generados por técnicas espectroscópicas.

Este punto tiene como objetivo validar la combinación de la espectrofotometría UV-vis y las herramientas inteligentes en distintas aplicaciones que solucionen problemáticas actuales del sector oleícola. Para testar esta fusión, en este apartado se describen distintas aplicaciones que se llevaron a cabo con el fin de aportar soluciones o ayudar en el control de calidad del sector olivícola.

Los ensayos realizados se dividen en cuatro bloques centrados en la variación de composición y/o calidad de los AOVE según distintas circunstancias. El primero y segundo están dedicados a las adulteraciones del AOVE (apartados 3.3.1. y 3.3.2.); el tercero se centra en la clasificación de AOVEs monovarietales (apartado 3.3.3.); y, por último, se aborda la degradación de los AOVEs en su cadena de transporte desde la almazara hasta las manos del propio consumidor (apartado 3.3.4.).

#### **3.3.1. Detección de la adulteración del AOVE con aceite de oliva refinado**

La adulteración intencionada de cualquier alimento es una acción fraudulenta que altera la calidad de los productos persiguiendo con ella un beneficio económico. Es una actividad que daña la imagen del producto por cuanto altera su calidad y, en algunos casos, afecta incluso la salud de los consumidores. Es por esto que enunciadas actividades ilícitas son perseguidas activamente por parte de la administración.

Dentro del sector oleícola, dado que el AOVE representa su producto estrella, la elevada calidad es premiada. Esto fomenta las buenas prácticas que llevan a una calidad exquisita del producto, la cual debe mantenerse hasta la compra por el cliente que es quien sostiene al sector y debe disfrutar de sus beneficios al completo, tanto sus atributos sensoriales como los valiosos para la salud. Desde el punto de vista de la administración, para proteger el mercado nacional e internacional del AOVE y, fundamentalmente, a los consumidores, es indispensable intentar poner fin a cualquier práctica fraudulenta.

Dada la intensidad del desarrollo tecnológico que existe actualmente en esta línea, existen distintas técnicas para la detección de adulterantes en este alimento funcional. Muchas de ellas, aunque son muy efectivas, presentan un coste elevado, características destructivas o requieren de una preparación previa de la muestra con lo que se dificulta su aplicación en línea. Con ánimo de ofrecer al sector un recurso barato, sin tratamiento previo y no destructivo, se ha desarrollado una herramienta basada en la combinación de la espectrofotometría UV-visible y algoritmos no lineales (redes neuronales artificiales). Esta combinación pretende demostrar que cuando se une una técnica analítica sencilla con una herramienta matemática potente, es posible mejorar considerablemente los resultados obtenidos con modelos clásicos sin incrementar los costes.

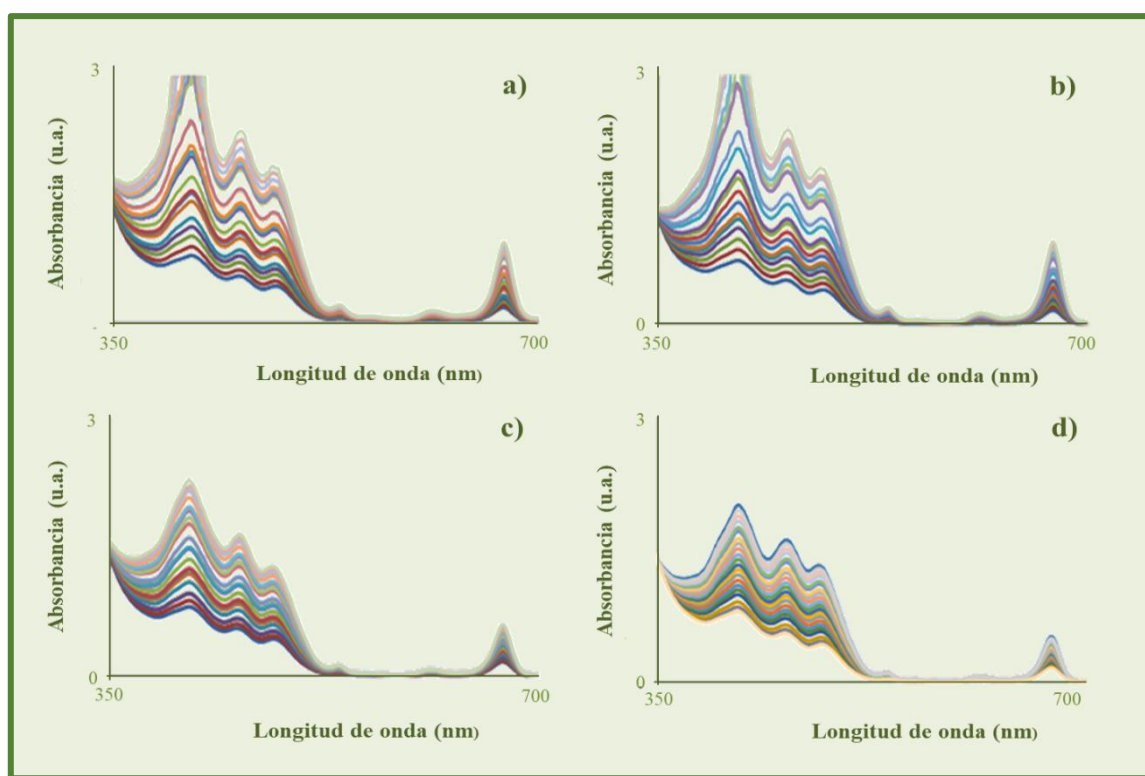
En la siguiente aplicación, se busca desarrollar un modelo matemático para la detección de adulterantes en distintos AOVEs monovarietales, específicamente Arbequina (Aceites Borges Pont S.A.U.), Hojiblanca (Aceites Borges Pont S.A.U.), Cornicabra (Aceites Toledo S.A.) y Picual (Aceites Borges Pont S.A.U.), que son las variedades de mayor producción en España. Estos aceites fueron adulterados con aceite de oliva refinado, que como se vio anteriormente, es muy semejante químicamente a ellos gracias a provenir del mismo fruto y, por tanto, presenta un perfil espectroscópico de absorción muy parecido al de los AOVEs (**figuras 22 y 23; vide supra**). Tal parecido hace que la detección de este adulterante sea más complicada que la de los otros analizados en los apartados 3.1 y 3.2, y es por esto que en el experimento aquí descrito se desea demostrar la fiabilidad de la técnica propuesta adulterando cuatro AOVE distintos con el aceite de oliva refinado.

En este experimento se prepararon 20 mezclas binarias de aceite de oliva refinado con cada uno de los cuatro AOVE monovarietales (**tablas 7 y 8**), haciendo un total de 80 muestras (Aroca-Santos, et al., 2016-a). Las mezclas se prepararon dentro de todo el intervalo de

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

porcentaje (0-100% en volumen), en saltos de 5%, sin ningún tipo de tratamiento previo o posterior de los aceites, característica que convierte a este método rápido en uno capaz de operar en continuo dentro del proceso de producción. Las medidas se realizaron por medio de un espectrofotómetro de UV-vis operando entre 350 y 750 nm. Las medidas se realizaron por triplicado, calculando la media en cada caso (**figura 24**).

Teniendo en cuenta los resultados estadísticos obtenidos en la comparación de modelos utilizando los máximos de las bandas de absorción o las ABCs como variables independientes (**tabla 9**), en esta aplicación se usaron las ABCs como variables independientes del modelo a desarrollar. En este caso, se calculó el ABC de cinco bandas de absorción. Los intervalos de longitudes de onda son de 440-472 nm, 473-526 nm, 527-551 nm, 593-630 nm y 631-703 nm para ABC<sub>1</sub>, ABC<sub>2</sub>, ABC<sub>3</sub>, ABC<sub>4</sub> y ABC<sub>5</sub>, respectivamente. Estas cinco bandas corresponden a los cinco nodos de entrada en el PMC.



**Figura 24.** Espectros de absorción de las 80 (20 de cada AOVE estudiado) mezclas binarias con los siguientes AOVes monovarietales: (a) Picual, (b) Cornicabra, (c) Hojiblanca y (d) Arbequina, donde los espectros de mayor intensidad corresponden a las mezclas con mayor porcentaje de AOVE.

Como capa de salida se incorporaron cinco neuronas que representan las variables dependientes del modelo. Una de las variables es la que da respuesta a la concentración de

AOVE y las otras cuatro están encargadas de identificar las variedades de aceituna. En concreto, para estas cuatro neuronas de salida se asignan los vectores (1,0,0,0), (0,1,0,0), (0,0,1,0) y (0,0,0,1), los cuales corresponden a las variedades Arbequina, Cornicabra, Hojiblanca y Picual, respectivamente. En cuanto a las neuronas presentes en la capa oculta del modelo, se testaron desde tres hasta ocho neuronas, encontrando que los mejores resultados se consiguen con cinco neuronas ocultas. La función de entrenamiento seleccionada fue trainBR dado que proporciona mejores resultados previos que cualquier otra función de entrenamiento probada. El resto de los parámetros fueron optimados por medio del diseño de experimentos mencionado en **Materiales y Métodos**, y se muestran en la **tabla 12**.

**Tabla 12.** Parámetros optimizados del PMC.

Parámetros seleccionados u optimizados	
Función de transferencia	Sigmoide
Función de entrenamiento	TrainBR
Número de nodos de entrada	5
Número de neuronas ocultas	6
Número de neuronas de salida	5
$L_c$	0,005
$L_{cd}$	0,01
$L_{ci}$	10

Para evaluar el porcentaje en volumen de AOVE en las mezclas, se utiliza la ecuación del error porcentual medio (EPM) (**ecuación 8**; página 53), mientras que, para obtener la tasa de identificación, las otras cuatro salidas de la red se convierten en vectores de cuatro números donde el valor más grande se transforma en un “1” y los tres restantes en “0”. Una vez estimados por la red, son comparados con los vectores reales para determinar la tasa de identificación (o de aciertos) del modelo.

Con el modelo matemático ya establecido, se realizaron dos validaciones. La primera se hizo en todo el intervalo de aplicación, coherente con la ventana de los datos generados. Por otro lado, se elaboró otra validación centrada en la zona de trabajo, para concentraciones de adulterante inferiores al 20% en volumen. La finalidad de esta última fue la de testar el modelo dentro de un intervalo más realista de contenido de adulterante en muestras de AOVEs. El

rendimiento de los modelos se muestra en la **tabla 13** y como se puede observar, se obtienen mejores resultados dentro del rango de porcentaje en volumen de adulterante del 1-20%.

**Tabla 13.** Resultados de las dos validaciones cruzadas (k-fold) del modelo diseñado.

Validación	Intervalo de adulterante (%)	Tasa de identificación (%)	EPM (%)
k-fold <sub>1</sub>	0-100	100	9,19
k-fold <sub>2</sub>	0-20	100	2,14

El modelo diseñado puede distinguir el tipo de AOVE adulterado con un acierto del 100% y aunque para la estimación de su concentración sí conlleva un error, este es en ambos casos inferior al 10% por lo que no imposibilita el uso de este modelo para el objetivo fijado. Si se reduce el ámbito de aplicación al 20% de concentración de adulterante, el modelo responde mejor al objetivo del trabajo. No obstante, se podrían obtener incluso mejores resultados si las concentraciones de adulterante de las muestras se redujeran al rango de utilidad.

En vista de los resultados obtenidos, se puede demostrar que cuando se une una técnica analítica sencilla como es la espectroscopia de absorción con una herramienta matemática potente, se obtienen resultados adecuados para la detección y por tanto prevención de adulteraciones en las variedades presentadas con aceite de oliva refinado. Este hecho abre otra puerta para la lucha contra la alteración fraudulenta de AOVes de distintas variedades, con un adulterante cuya composición química es muy similar a la del AOVE. Por último, esta investigación ha dado lugar a una publicación donde se describe esta útil herramienta y sus resultados (Aroca-Santos *et al.*, 2016-a).

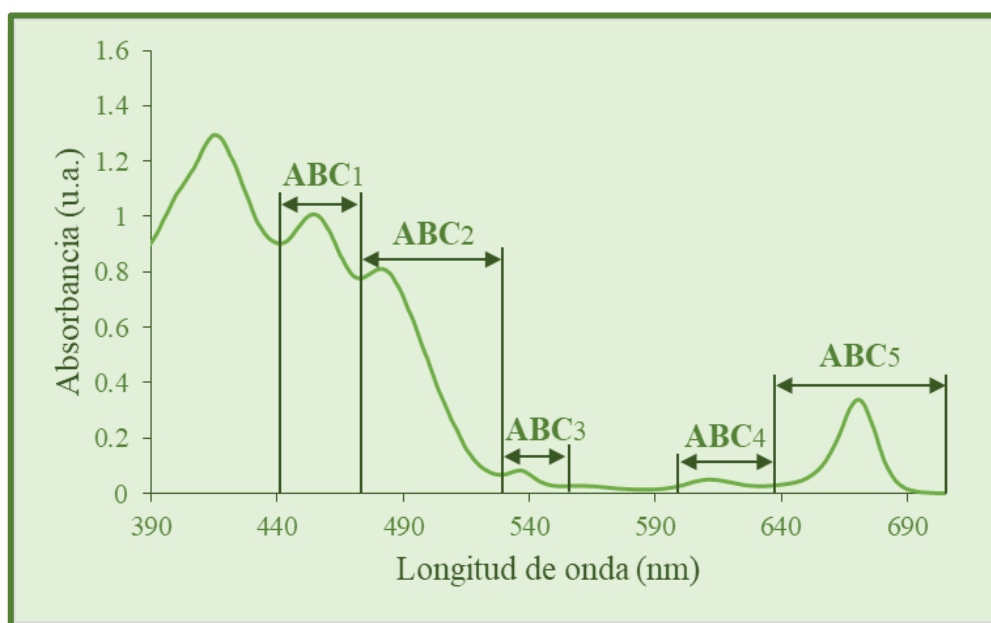
### 3.3.2. Detección de la adulteración del AOVE en mezclas binarias y ternarias

Para seguir incidiendo en este importante problema del sector oleícola, se propuso el desarrollo de modelos matemáticos para la detección de adulteraciones con mezclas binarias y ternarias de aceites. En este caso se empleó un aceite con denominación de origen protegido, AOVE Siurana (**tabla 7**) y los adulterantes utilizados fueron los aceites de soja y almendra (**tabla 8**) (Tsopelas *et al.*, 2018). Estas adulteraciones, a priori, no generan afecciones para la salud del consumidor (Nocella *et al.*, 2018; Figueiredo-González *et al.*, 2018), pero no responden

a las reglas de etiquetado del envasado de los AOVE y nunca se puede asegurar que no desemboquen en reacciones alérgicas (Chen *et al.*, 2006).

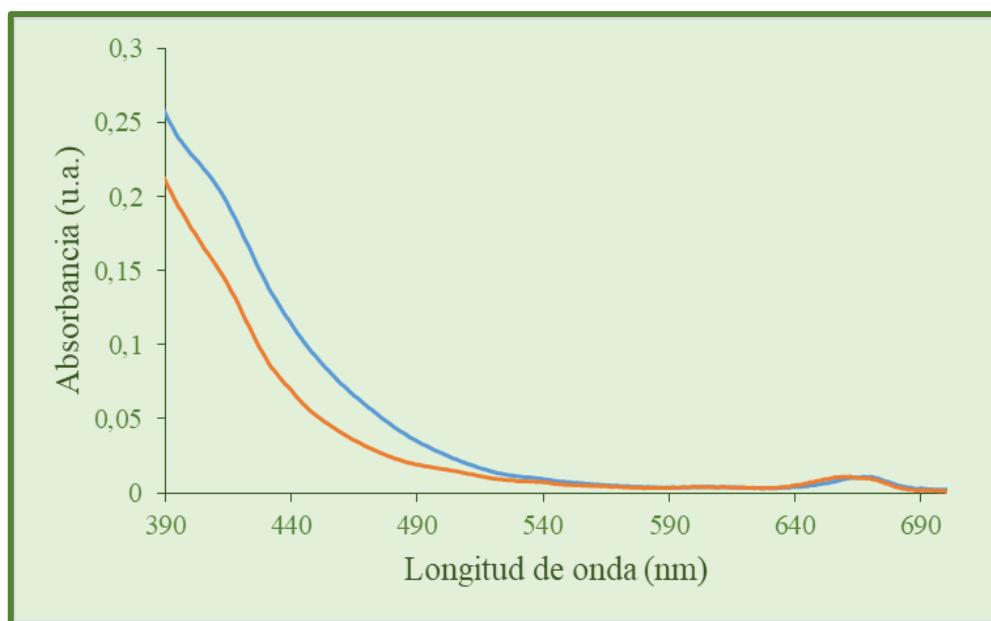
Para verificar si la combinación entre herramientas espectroscópicas y los modelos no lineales es adecuada para detectar uno y dos adulterantes, se midieron 141 muestras de aceites, incluyendo una muestra pura de AOVE Siurana, 20 mezclas binarias del AOVE con aceite de soja, otras 20 mezclas binarias del AOVE con aceite de almendra y 100 mezclas ternarias compuestas por los tres aceites estudiados (AOVE, soja y almendra). La concentración mínima de AOVE en todas las muestras fue del 80% en volumen, para permanecer siempre dentro de un rango razonable de cantidad de adulterante (0-20%).

Los perfiles de los espectros de absorbancia en el visible de los aceites de soja y almendra difieren mucho de los del AOVE testado (**figuras 25 y 26**). Esta diferencia resulta muy beneficiosa para detectar la presencia de dichas adulteraciones.



**Figura 25.** Espectro de absorción del AOVE Siurana y rango de las ABCs (variables independientes del PMC).

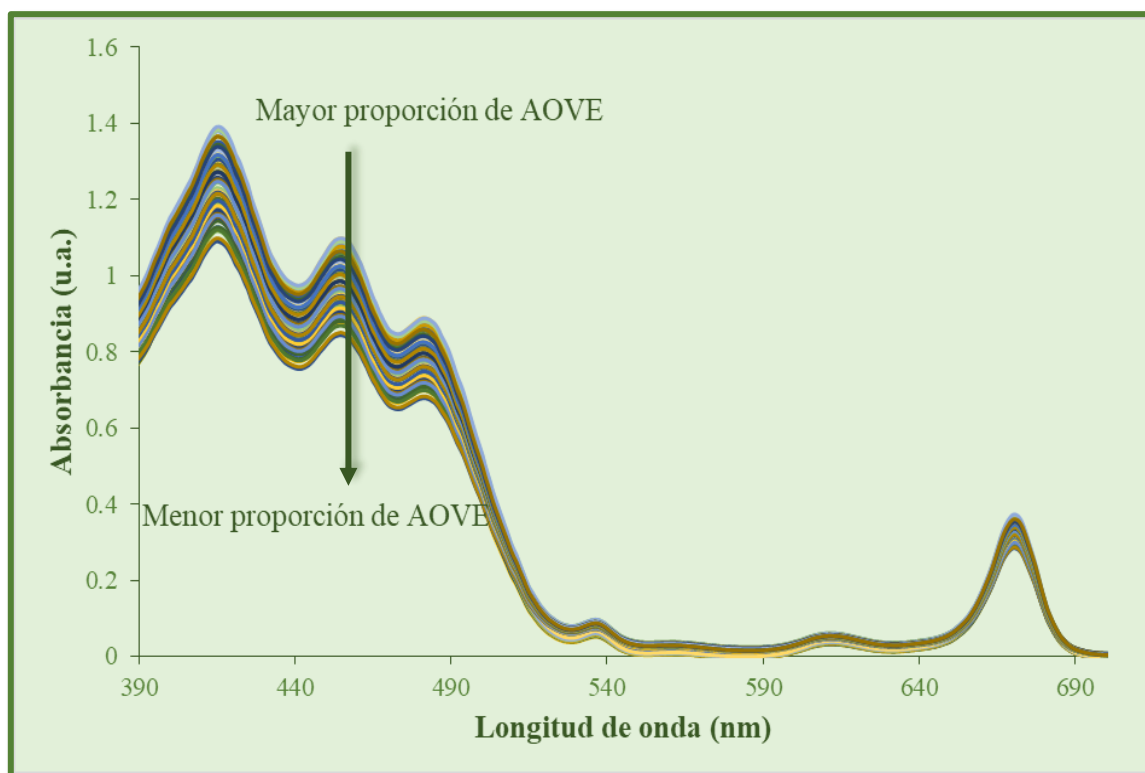




**Figura 26.** Espectros de absorción del aceite de soja (**azul**) y el aceite de almendra (**naranja**).

El perfil de los espectros resultantes de las mezclas (AOVE, soja y almendra) es semejante al del componente mayoritario, pero al incrementar la concentración de adulterante decrece la intensidad de la señal (**figura 27**). Por otro lado, al tratarse de una mezcla ternaria de adulterantes, el aumento de la concentración de adulterantes no es directamente proporcional a la intensidad de la señal, con lo que el tratamiento de la señal se hace más complejo. Por ello, es necesario establecer modelos no lineales para tratar esta información.

Una vez conseguidos los espectros de UV-vis de las 141 mezclas, se calcularon las ABCs de las cinco bandas cuyos máximos de absorción se encuentran entre 440-472 nm ( $ABC_1$ ), 473-526 nm ( $ABC_2$ ), 527-551 nm ( $ABC_3$ ), 593-630 nm ( $ABC_4$ ) y 631-703 nm ( $ABC_5$ ) (**figura 25**). Las variables independientes de entrada del perceptrón fueron estas cinco ABCs y como variables dependientes se pusieron el porcentaje en volumen de aceite de almendra y el del aceite de soja en las mezclas. Estas variables de entrada coinciden con las variables independientes de la aplicación tecnológica descrita anteriormente donde se detectaba la adulteración con aceite de oliva refinado.



**Figura 27.** Espectros de absorción de todas las mezclas ternarias de AOVE, aceite de soja y aceite de almendra medidas, donde los espectros de mayor absorbancia corresponden a las mezclas con mayor proporción de AOVE.

En este caso, se ha diseñado un modelo no lineal que estima la concentración en volumen de los aceites de soja y almendra, con lo que el modelo tiene dos neuronas en la capa de salida. En cuanto a las neuronas ocultas del modelo, se testaron desde tres hasta 13 neuronas, encontrando que la mejor combinación es de 10 neuronas ocultas. La función de entrenamiento seleccionada fue trainBR, como en la aplicación anterior. El resto de los parámetros fueron optimados por medio de un diseño de experimentos (*vide supra*) y aparecen todos en la **tabla 14**.

**Tabla 14.** Parámetros optimizados del PCM diseñado para la detección de aceite de soja y almendra en muestras de AOVE.

Parámetros seleccionados u optimizados	
Función de transferencia	Sigmoide
Función de entrenamiento	TrainBR
Número de nodos de entrada	5
Número de neuronas ocultas	10
Número de neuronas de salida	2
$L_c$	0,9
$L_{cd}$	0,1
$L_{ci}$	10

Una vez que diseñado y verificado el modelo no lineal, se procedió a su validación por medio de una validación cruzada ( $k=6$ ) (**tabla 15**). A la vista de estos resultados, se aprecia que la estimación de las concentraciones de los dos adulterantes tanto en las mezclas binarias como en las ternarias, se puede estimar con errores inferiores al 3%.

**Tabla 15.** Resultados de la validación cruzada del PMC.

	EAM (%)	
	Aceite de Soja	Aceite de Almendra
Error medio de estimación	2,93	2,84

Estos resultados estadísticos permiten garantizar que el empleo de esta combinación de herramientas lleva a una estimación precisa de la concentración de los adulterantes vegetales analizados en las mezclas ternarias de AOVE.

Con el objetivo de demostrar la diferencia entre el tratamiento matemático por medio de algoritmos lineales clásicos y no lineales, en este desarrollo se utilizaron los dos modelos con una misma muestra de datos ajenos a su proceso de diseño y se analizaron las diferencias. En la **tabla 16**, se puede comprobar que el error absoluto medio de estimación del modelo no lineal mejora en más del 30% y 26% respecto al del modelo clásico, en cuanto a la estimación del contenido de aceite de soja y aceite de almendra, respectivamente, en las mezclas estudiadas.

**Tabla 16.** Error absoluto medio de los modelos lineales (regresión de mínimos cuadrados; RMC) y el no lineal (PMC), del porcentaje en volumen de aceite de soja y de almendra.

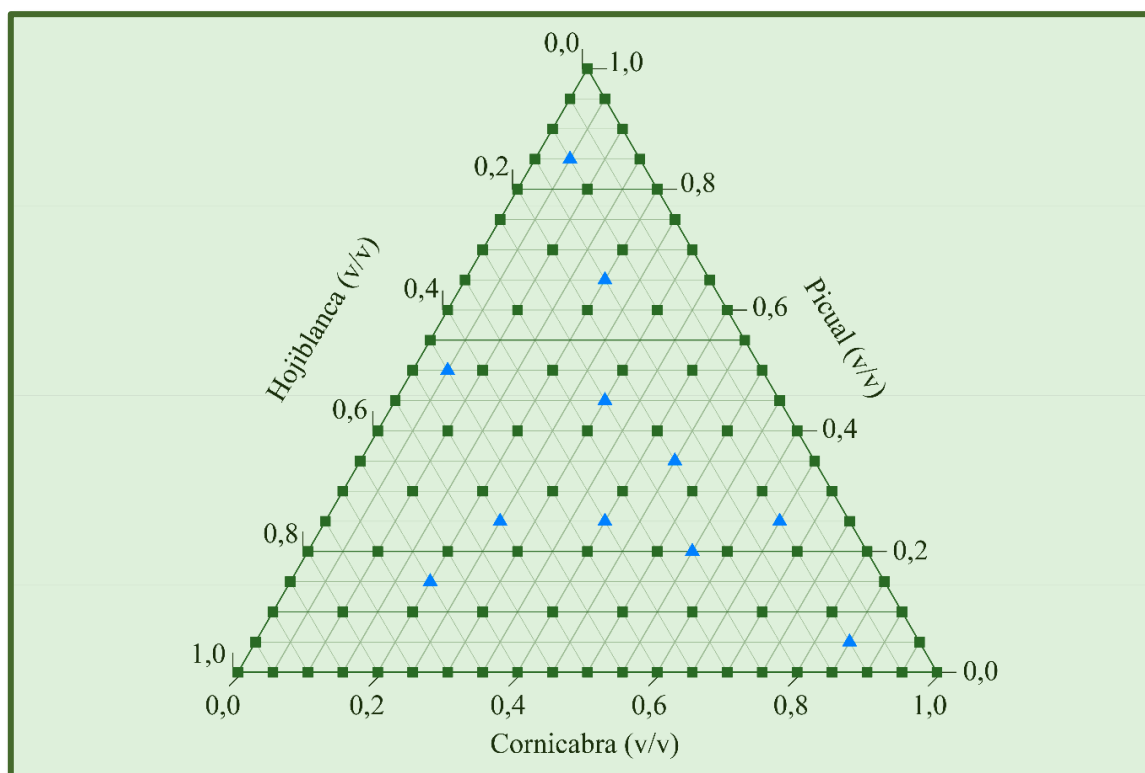
	EAM (% en volumen)	
Modelo	Aceite de Soja	Aceite de Almendra
RMC	4,05	3,77
PMC	2,80	2,78

Con estos resultados como prueba, se puede concretar que la combinación de herramientas espectroscópicas y quimicométricas inteligentes es capaz de ofrecer una respuesta efectiva en el control de calidad del AOVE, y dichos datos han dado lugar a una publicación (Aroca-Santos *et al.*, 2018-a). A continuación, se analizarán casos relacionados con la protección del consumidor frente a etiquetados ilícitos, donde no hay una correlación real entre la información que se indica en el envase y el contenido de este.

### 3.3.3. Clasificación de los AOVE monovarietales

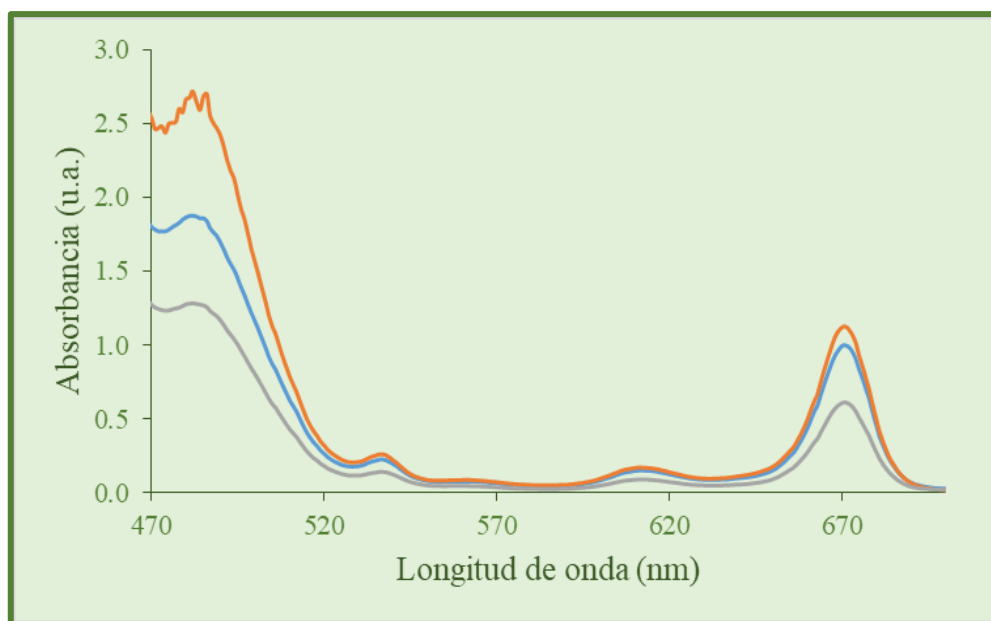
En el funcionamiento diario de una almazara en época de molturación, se recoge una gran cantidad de aceitunas. El hecho de asegurar que cada uno de los frutos pertenece a una variedad en concreto dificulta notablemente la producción. Todo esto se traduce en un incremento en el precio de venta del AOVE monovarietal. Es por lo que en esta sección se ha desarrollado una aplicación para la clasificación de tres AOVE monovarietales y sus respectivas mezclas.

Las concentraciones de todas las moléculas que componen un AOVE presentan fluctuaciones dependiendo de la variedad de aceituna, e incluso dentro de una misma variedad (Longobardi *et al.*, 2012). De entre todos los compuestos, los pigmentos son uno de los grupos más relevantes (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1991; Gandul-Rojas *et al.*, 2016). Dentro de este grupo, se encuentran las clorofilas y los carotenoides (*vide supra*), que absorben en el espectro visible (Aroca-Santos *et al.*, 2016-a; Lazzarini *et al.*, 2016). Los AOVEs monovarietales analizados fueron de la variedad Hojiblanca (Aceites Borges Pont S.A.U.), Cornicabra (Aceites Toledo S.A.) y Picual (Aceites Borges Pont S.A.U.) (tabla 7). Con los tres AOVEs mencionados, se prepararon un total de 96 muestras (figura 28), de las cuales tres fueron las de los AOVE puros, 57 mezclas binarias dentro de todo el rango de concentración (0-100%), con incrementos del 5% en volumen, y 36 mezclas ternarias de igual forma que las binarias, pero con incrementos del 10% en volumen.



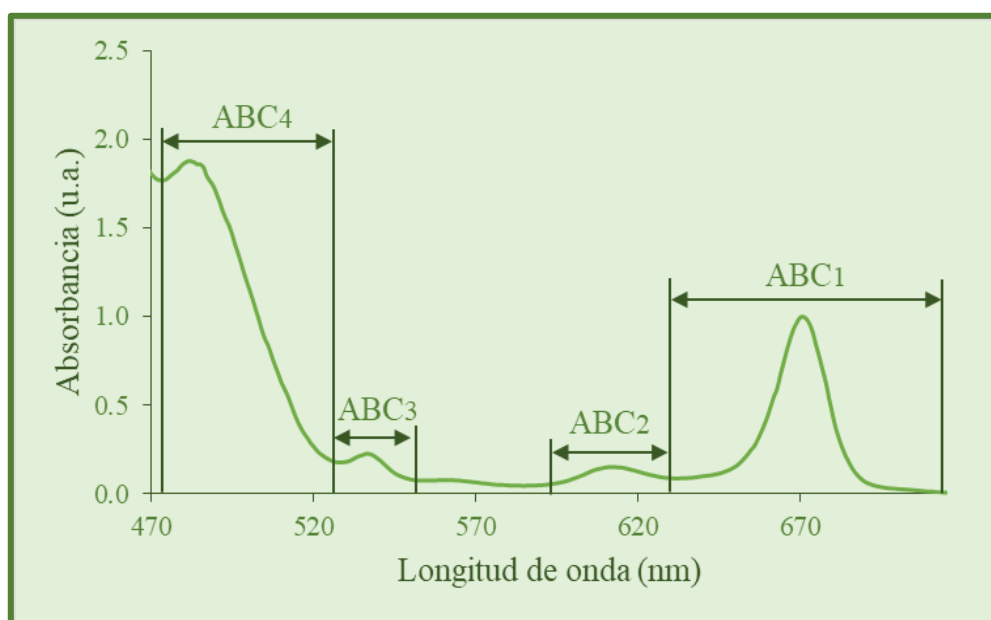
**Figura 28.** Composición de las 96 muestras preparadas para entrenar los modelos (cuadrados) y de las 11 mezclas ternarias utilizadas en la validación interna (rectángulos).

Las 96 muestras fueron medidas por triplicado en un espectrofotómetro de UV-vis, utilizándose su media como medida representativa de la composición estudiada en cada caso. En la **figura 29** se pueden apreciar las diferencias de intensidad de las bandas más representativas de los espectros de los tres AOVE monovarietales (muestras puras).



**Figura 29.** Espectros de absorción de los tres aceites monovarietales estudiados: Picual (**naranja**), Cornicabra (**azul**) y Hojiblanca (**gris**).

Al igual que en los desarrollos tecnológicos anteriores, se calcularon las ABCs de los 96 espectros medidos. En este caso se calcularon cuatro ABCs (**figura 30**). En particular,  $ABC_1$  engloba de 631 a 713 nm,  $ABC_2$  de 593 a 630 nm,  $ABC_3$  de 527 a 551 nm y finalmente el  $ABC_4$  de 473 a 526 nm. Estas cuatro áreas se utilizaron como las variables independientes del modelo.



**Figura 30.** Intervalos de longitud de onda seleccionados para las distintas ABC. El ejemplo mostrado corresponde a la muestra pura del aceite Cornicabra.

Como se aprecia en las **figuras 29 y 30**, en este experimento no se tuvieron en cuenta las bandas que aparecen a longitudes de onda inferiores a 470 nm aunque también están relacionadas con los pigmentos de los AOVE estudiados (Ayuso *et al.*, 2004). Esto se hizo así porque las muestras que contenían altas concentraciones de AOVE Picual, presentaban unas bandas tan intensas en esa zona del espectro, que saturaban el equipo y, por tanto, esas bandas se retiraron de la base de datos y llevaron a emplear cuatro bandas de absorción en vez de cinco como en los estudios descritos anteriormente. No se optó por realizar diluciones de estas muestras para seguir con el criterio de ausencia de tratamientos previos de las muestras.

Para esta aplicación se desarrollaron dos modelos en función del número de variables independientes utilizados. Se debe de tener en cuenta que, tras considerar los resultados del modelo, los algoritmos que requieran una menor información de entrada para realizar las estimaciones son notablemente más versátiles. En este caso, las cuatro bandas escogidas para hacer el tratamiento matemático se dividieron en dos partes para crear dos PMC. En el primer modelo, las cuatro ABCs formaron las variables independientes y en el segundo modelo únicamente se usaron ABC<sub>1</sub> y ABC<sub>4</sub>, con el fin de ver si las dos eliminadas, que corresponden a las bandas de menor intensidad, proporcionan información relevante como para que sea necesaria su inclusión, o si con un modelo de dos variables independientes se pueden obtener resultados comparables.

La capa de salida de ambos modelos está integrada por tres neuronas. Cada una de ellas ofrece la estimación del porcentaje en volumen de cada uno de los aceites monovarietales estudiados. En la **tabla 17** se muestran los parámetros optimizados de los dos modelos desarrollados.

En cuanto a las neuronas ocultas de los modelos, se probaron de 3 a 7 neuronas en el modelo con 4 variables independientes y de 3 a 14 centros de cálculo en el otro modelo testado. Se encontró que las mejores combinaciones fueron de 7 y 8 neuronas ocultas, respectivamente. La función de entrenamiento que dio lugar a mejores resultados fue trainLM en este caso. El resto de parámetros fueron optimados por medio de un diseño de experimentos (*vide supra*) como en todos los casos anteriores. Los parámetros optimizados del modelo se muestran en la **tabla 17**.

**Tabla 17.** Parámetros optimizados de los dos PMC diseñados para la estimación de la composición de AOVEs monovarietales dentro de mezclas binarias y ternarias de tales aceites.

Parámetros seleccionados u optimizados	2-ABC	4-ABC
Función de transferencia	Sigmoide	
Función de entrenamiento	TrainLM	
Número de nodos de entrada	2	4
Número de neuronas ocultas	8	7
Número de neuronas de salida	3	
$L_c$	0,070	0,001
$L_{cd}$	0,008	0,110
$L_{ci}$	12	10

La validación de los modelos desarrollados se hizo mediante una validación interna y otra cruzada. Para la validación interna, se prepararon once mezclas ternarias de los tres aceites monovarietales estudiados (**figura 28**). Según se muestra en la figura, estas muestras pertenecientes a la validación interna están interpoladas en el espacio perteneciente a las muestras de aprendizaje y verificación.

En la **tabla 18** se muestran los resultados de las dos validaciones realizadas para ambos modelos desarrollados. Cabe destacar que el mayor error de estimación en ambos modelos se produce en la evaluación de la concentración del AOVE Picual. Por otro lado, el número de variables independientes utilizadas influye en gran medida sobre el modelo, reduciendo el error de estimación hasta en más del 62% cuando se emplean las cuatro bandas (*vide supra*), para la validación interna de la variedad Picual.

**Tabla 18.** Resultados de la validación cruzada (k-fold) y la interna (VI) de los dos PMC.

		2-ABC		4-ABC	
		EAM <sub>k-fold</sub>	EAM <sub>VI</sub>	EAM <sub>k-fold</sub>	EAM <sub>VI</sub>
AOVE	Cornicabra	2,8	1,5	2,4	2,0
	Picual	2,8	8,0	2,4	3,0
	Hojiblanca	2,7	6,0	2,4	2,0
Valor medio del EAM		2,8	5,2	2,4	2,3



Teniendo en cuenta el promedio de los errores de estimación, el modelo que utiliza cuatro variables independientes muestra unos errores de estimación inferiores, por lo que está claro que tanto ABC<sub>2</sub> como ABC<sub>3</sub> juegan un papel importante en el estudio de los pigmentos de los AOVE, pero aun así, ambos modelos pueden ser útiles para la estimación de las composiciones de los AOVEs estudiados en mezclas ternarias dependiendo de las especificaciones requeridas. Esta investigación, ha dado lugar a una publicación científica donde se describe dicha herramienta, sus resultados y aplicabilidad (Aroca-Santos *et al.*, 2016-b).

### 3.3.4. Degradación del AOVE en función de las condiciones de su entorno

Los desarrollos tecnológicos presentados en este trabajo hasta el momento, abren una puerta hacia el control de calidad de los AOVE mediante la detección de adulteraciones con aceites de menor calidad o también por la mezcla fraudulenta de distintas variedades de AOVE, y todo esto se ha conseguido con la combinación de la espectrofotometría UV-visible y un tipo de redes neuronales artificiales.

Para posibilitar la aplicación directa de esta información y que le sea útil al propio consumidor, sería interesante el diseño de un equipo capaz de medir de forma sencilla la degradación de los AOVEs en función de las condiciones de almacenamiento, ya sea en los almacenes, en los lineales de venta al público o en los mismos domicilios. Siendo este el objetivo fundamental del bloque final de desarrollos tecnológicos descrito a continuación.

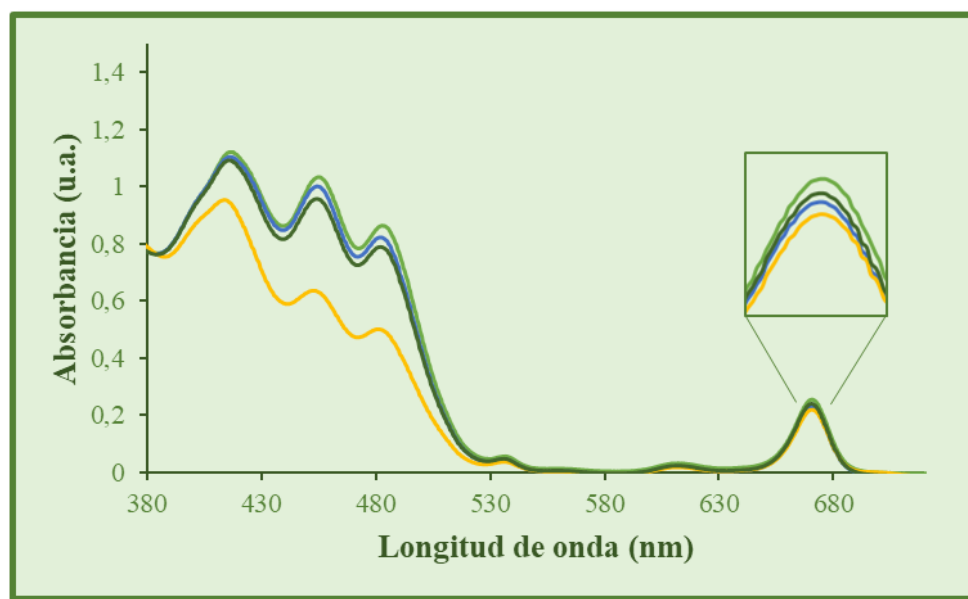
La degradación de los AOVEs se puede monitorizar mediante el control de cualquiera de los compuestos que sufren cambios en su estructura a causa de variaciones en las condiciones del aceite, como por ejemplo la temperatura, la luz y el contacto con el oxígeno, entre otros. El análisis de los pigmentos que caracterizan a estos aceites es una buena opción para este propósito debido a que tanto las clorofilas como los carotenoides son bastante sensibles a fluctuaciones en su entorno y en las condiciones físicas del AOVE (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2010; Aparicio-Ruiz *et al.*, 2011; Anniva *et al.*, 2006; Psomiadou *et al.*, 2002-a; Psomiadou *et al.*, 2002-b).

#### *3.3.4.1. Degradación del AOVE en función de la temperatura y el tiempo de almacenamiento*

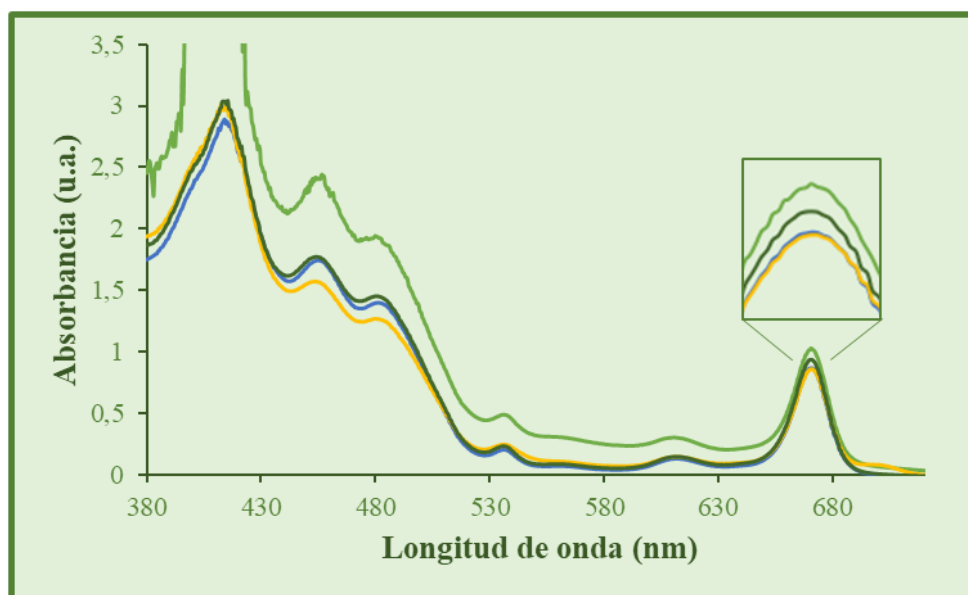
La temperatura de almacenamiento es una de las variables ambientales que más afecta al mantenimiento de la calidad del AOVE. La termodegradación del aceite de oliva es un factor a estudiar ya que desde que los AOVE son envasados hasta que llegan a manos del consumidor pueden haber sufrido distintos cambios de temperatura. Estos cambios térmicos pueden ser notables si se realiza algún transporte marítimo o largas distancias por carretera.

Para el desarrollo de esta herramienta se contó con AOVE de las variedades Empeltre (Almazara del Ebro) y Manzanilla Cacereña (As Pontis) (**tabla 7**). Las muestras estudiadas de estos aceites se mantuvieron en ausencia de luz y se almacenaron en frío (3°C), caliente (40°C) y a temperatura ambiente (20-24°C) ([Aroca-Santos \*et al.\*, 2018-b](#)) durante aproximadamente tres meses (88 días). En este periodo de tiempo se realizaron un total de 52 medidas para cada una de las cuatro muestras que estuvieron a 3°C y a 40°C, con el espectrofotómetro de UV-vis operando de 350 a 750nm. Todo el diseño fue elaborado utilizando, por lo tanto, 210 medidas espectroscópicas. Las muestras a temperatura ambiente únicamente se midieron el primer y el último día del experimento para comparar su degradación final con la de las otras muestras.

En las **figuras 31 y 32** se muestran los espectros de absorción de las tres muestras (3°C, 40°C y temperatura ambiente) de los dos AOVE, medidas en el octogésimo octavo día y un espectro más de las muestras a temperatura ambiente medidas el primer día. Se debe tener en cuenta que la calidad del AOVE se aprecia, como en los casos anteriores, según la variación de intensidad en las bandas de absorción de los espectros. En ambas figuras se aprecia que a temperatura ambiente los dos aceites se degradan menos que al haber sido almacenados a 3 y 40°C. También se observa que el AOVE proveniente de la Almazara del Ebro almacenado a 40°C presenta una mayor degradación que la muestra guardada en frío, mientras que para el AOVE As Pontis, ambas condiciones (frío y calor) afectan al aceite casi por igual.



**Figura 31.** Espectros de absorción del aceite Almazara del Ebro, donde el **verde claro** representa la muestra a temperatura ambiente (día 1), el **azul** a la muestra a 3°C (día 88), el **verde oscuro** a la muestra a temperatura ambiente (día 88) y el **amarillo** a la muestra a 40°C (día 88).



**Figura 32.** Espectros de absorción del aceite As Pontis, donde el **verde claro** representa la muestra a temperatura ambiente (día 1), el **azul** a la muestra a 3°C (día 88), el **verde oscuro** a la muestra a temperatura ambiente (día 88) y el **amarillo** a la muestra a 40°C (día 88).

Para el tratamiento matemático de los datos obtenidos, se diseñó un modelo basado en PMC para cada uno de los AOVEs testados. Como variables independientes, se utilizaron las intensidades de los cuatro máximos de absorción a 487 nm, 538 nm, 616 nm y 672 nm de los respectivos espectros. En ambos modelos se fijaron dos variables dependientes, una para la

estimación de la temperatura y otra para el tiempo de almacenamiento. En cuanto a las neuronas ocultas de ambos modelos, se probaron de 3 a 6 neuronas ya que es el intervalo adecuado para este sistema (*vide supra*) y se encontró que el valor óptimo eran 3 y 4 neuronas ocultas, para los modelos del AOVE Almazara del Ebro y As Pontis, respectivamente. El resto de los parámetros fueron optimados mediante un diseño de experimentos (*vide supra*) y aparecen todos en la **tabla 19**.

**Tabla 19.** Parámetros optimizados de los dos modelos desarrollados.

Parámetros seleccionados u optimizados	Almazara del Ebro	As Pontis
Función de transferencia	Sigmoide	
Función de entrenamiento	TrainLM	
Número de nodos de entrada	4	4
Número de neuronas ocultas	3	4
Número de neuronas de salida	2	
$L_c$	0,5005	0,001
$L_{cd}$	0,5005	0,001
$L_{ci}$	100	2

Ambos modelos diseñados fueron evaluados mediante una validación cruzada y una validación interna. Los principales resultados se muestran en la **tabla 20**, donde la fiabilidad de los modelos se valora con el cálculo del error absoluto medio (EAM). Este error describe la calidad de los modelos atendiendo al error en la estimación del número de días que permanecieron las muestras bajo las condiciones estipuladas, a la vez que a la identificación de la temperatura a la cual se conservaron dichas muestras.

**Tabla 20.** Resultados de la validación cruzada (k-fold) e interna (VI) de ambos modelos desarrollados.

	Almazara del Ebro		As Pontis	
Validación	EAM (días)	Identificación (%)	EAM (días)	Identificación (%)
k-fold	5,52	100	3,81	100
VI	6,05	100	3,67	100

Cuando se trata de estimar el número de días que lleva el AOVE en dichas condiciones, el modelo diseñado para el aceite Almazara del Ebro da errores absolutos medios de 5,52 y 6,05 días para el k-fold y la validación interna, respectivamente. Estos errores equivalen a un 6,27% y 6,87% del periodo de 88 días durante el cual se midieron las muestras. En el caso del aceite As Pontis, estos porcentajes son del 4,33% y 4,17% para el k-fold y la validación interna, respectivamente. Por otro lado, atendiendo a los resultados mostrados en la **tabla 20**, los modelos desarrollados determinan perfectamente la temperatura a la cual estuvieron almacenados ambos AOVes.

Los dos AOVes analizados en este bloque, se encuentran dentro de la fecha de consumo preferente pero no se tiene constancia de su fecha de producción ni de su fecha de envasado. No obstante, este desarrollo experimental se ha realizado con el fin de comparar la degradación sufrida por estos dos aceites a dos temperaturas distintas, durante un periodo aproximado de tres meses desde la apertura del envase. Considerando estas condiciones, puede repetirse el mismo diseño experimental y tratamiento de datos para cualquier otro AOVE y otras fechas de compra, siempre y cuando los aceites estén dentro de la fecha de consumo preferente. Dada la eficacia de los resultados estadísticos, la facilidad y la rapidez de respuesta, esta tecnología permite la predicción del trato o las condiciones sufridas por el AOVE hasta el momento de su análisis y así consigue localizar posibles puntos en los que el producto haya sido maltratado durante su cadena de distribución. Esta investigación de las condiciones de almacenamiento ha llevado a la publicación reciente de la herramienta descrita ([Aroca-Santos \*et al.\*, 2018-b](#)).

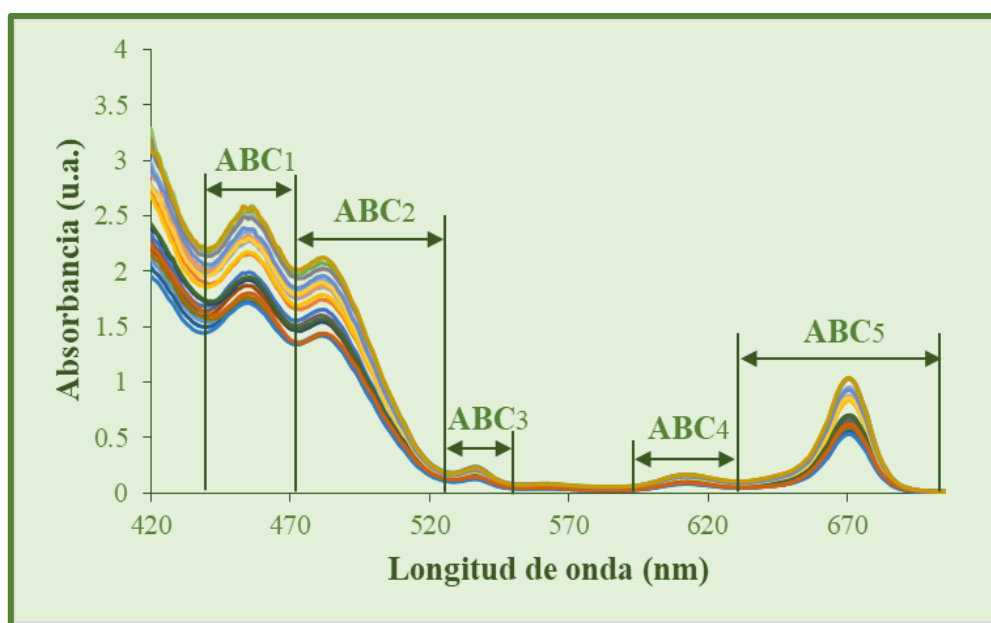
### *3.3.4.2. Fotodegradación del AOVE*

Una vez analizada la relación de la calidad del AOVE con la temperatura y el tiempo, se aborda la influencia de la luz para continuar con el objetivo fundamental del último bloque de desarrollos. La presencia de luz es otra de las condiciones de almacenamiento que afecta notablemente a la calidad del AOVE, sobre todo en los centros de almacenamiento, los lineales de venta en centros comerciales e incluso en los propios domicilios de consumidores.

Siguiendo con el propósito de todo este trabajo, el uso de la composición de los pigmentos (clorofilas y carotenoides) que caracterizan a los AOVes, es una buena opción para evaluar el grado de influencia que tiene la exposición de muestras de AOVE a la luz. Esto es debido a la sensibilidad de estas moléculas frente a fluctuaciones en la irradiación lumínica, la cual

favorece su degradación (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2010; Aparicio-Ruiz *et al.*, 2011; Anniva *et al.*, 2006; Psomiadou *et al.*, 2002-a; Gandul-Rojas *et al.*, 2016; Lazzerini *et al.*, 2017).

Para comprobar la influencia de la incidencia de la luz sobre la calidad del AOVE, se han utilizado cuatro aceites monovarietales de las variedades Arbequina (Marqués de Griñón), Hojiblanca (Aceites Borges Pont S.A.U.), Cornicabra (Enclaves D. Oro) y Picual (Castillo de Tabernas) (**tabla 7**). Con ellos, se prepararon un total de 22 muestras, cuatro de ellas siendo las de los AOVE puros y las demás, mezclas binarias de un 25%, 50% y 75% en volumen de todas las posibles combinaciones de estos cuatro aceites (**figura 33**).



**Figura 33.** Espectros de absorción de las 22 muestras preparadas medidas el primer día y rangos de las ABCs utilizadas como variables independientes.

Una vez hechas, las muestras se expusieron a luz solar indirecta y se midieron, junto con una muestra de referencia que se guardaba en la oscuridad, en un espectrofotómetro de UV-vis de lunes a viernes durante 45 días (Torrecilla *et al.*, 2015). Con los 660 espectros obtenidos (22 muestras  $\times$  30 medidas), se calcularon las ABC de cinco bandas de absorción, siendo ABC<sub>1</sub> de 440 a 472 nm, ABC<sub>2</sub> de 473 a 526 nm, ABC<sub>3</sub> de 527 a 551 nm, ABC<sub>4</sub> de 593 a 630 nm y ABC<sub>5</sub> de 631 a 703 nm (**figura 33**).

Las cinco ABCs se utilizaron como variables independientes del modelo testado. El número de variables dependientes del modelo es uno, cantidad que se corresponde con la única variable dependiente que es el tiempo de degradación sufrido por los AOVE. Para obtener el

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

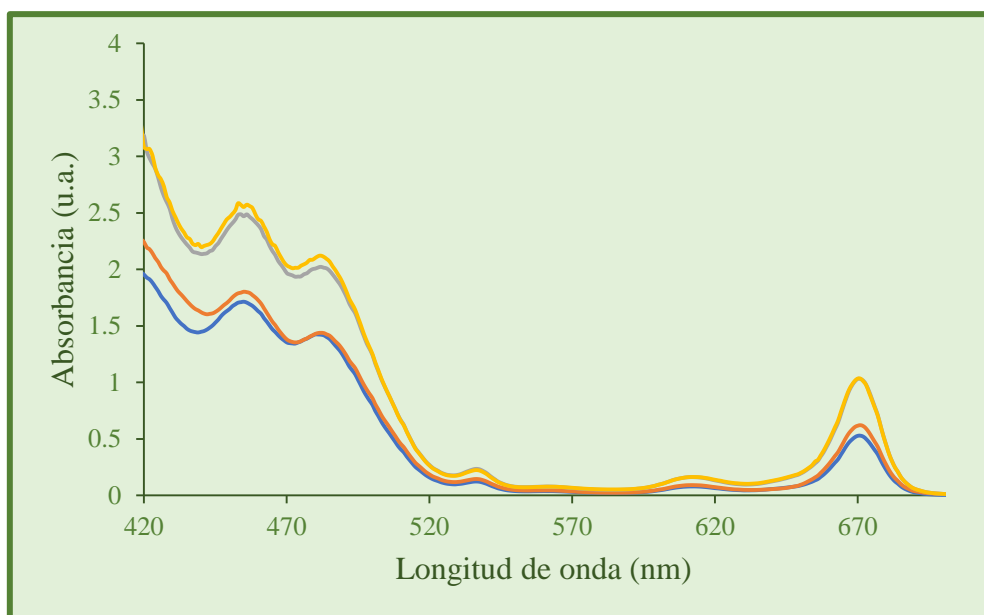
mejor NNO, se probaron de 3 a 30 neuronas ocultas y se comprobó que 18 era el valor óptimo para dicho modelo. Los resultados obtenidos con la muestra de verificación para esta topología fueron de 2,55 días de error de estimación y un coeficiente de correlación igual a 0,92. El resto de los parámetros fueron optimados por medio del diseño de experimentos ya mencionado (*vide supra*) (**tabla 21**).

**Tabla 21.** Parámetros optimizados del modelo desarrollado.

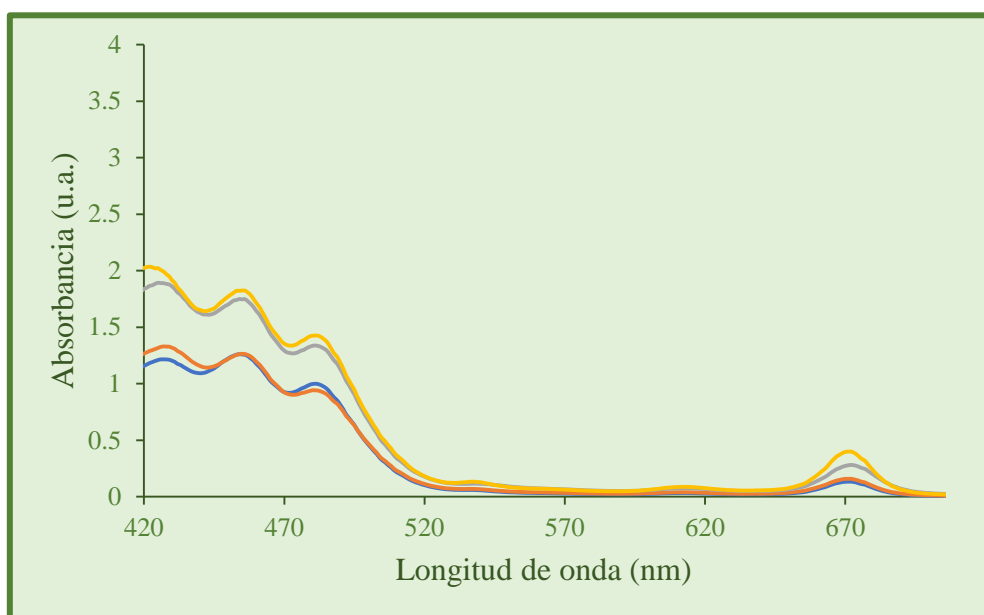
Parámetros seleccionados u optimizados	
Función de transferencia	Sigmoide
Función de entrenamiento	TrainLM
Número de nodos de entrada	5
Número de neuronas ocultas	18
Número de neuronas de salida	1
$L_c$	0,001
$L_{cd}$	0,001
$L_{ci}$	2

El modelo no lineal optimado se validó mediante una validación cruzada ( $k=6$ ), dando un error absoluto medio de estimación de 2,43 días, que equivalen al 5,3% del tiempo de medida. Este resultado hace de la herramienta diseñada un modelo útil para el seguimiento de la evolución de la calidad de los AOVEs.

La muestra de AOVE almacenada en la oscuridad y medida como referencia, no presentó variación significativa en el perfil de su espectro, mientras que las demás muestras sí, como se aprecia en las **figuras 34 y 35** con la disminución en la absorbancia de los espectros medidos el último día respecto a los medidos el primer día. Es por esto que se puede decir que la causa de la alteración de la calidad del aceite durante este experimento es fundamentalmente el efecto de la luz, al ser este el único factor distinto entre las muestras estudiadas y la de referencia (ambos tipos de muestras se mantuvieron a la misma temperatura). Esto quiere decir que con información espectroscópica y los modelos matemáticos desarrollados, se puede llegar a predecir el tiempo que lleva un AOVE expuesto a tales condiciones.



**Figura 34.** Espectros de absorción de los cuatro AOVE puros medidos el primer día del experimento. Picual (**amarillo**), Cornicabra (**gris**), Hojiblanca (**naranja**) y Arbequina (**azul**).



**Figura 35.** Espectros de absorción de los cuatro AOVE medidos el último día del experimento. Picual (**amarillo**), Cornicabra (**gris**), Hojiblanca (**naranja**) y Arbequina (**azul**).

En esta tesis doctoral se han presentado varias aplicaciones directamente vinculadas con el sector oleícola y con su vertiente más comercial a nivel nacional e internacional. Con ayuda de un espectrofotómetro de UV-visible y la aplicación de una herramienta basada en algoritmos inteligentes se ha conseguido la detección de distintos adulterantes, como los aceites de oliva de menor calidad y otros aceites vegetales. También ha sido posible la clasificación de distintos



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

AOVE monovarietales dentro de mezclas binarias y ternarias y, por último el estudio de las consecuencias del tiempo, la temperatura y la luz en la calidad de los AOVE.

En vista de los resultados estadísticos obtenidos, la espectrofotometría UV-visible es una técnica económica, rápida, no destructiva y de fácil manejo que junto con la ayuda de algoritmos inteligentes basados en redes neuronales, que pueden ser implementados de forma simple en portátiles e incluso en la red, genera una herramienta capaz de ofrecer una serie de ventajas muy útiles para el sector olivícola y el propio consumidor. La naturaleza intrínseca de estos algoritmos además permite la actualización periódica de sí mismos cuando se generan nuevos datos, llevando a versiones más potentes y robustas de las herramientas diseñadas tras la incorporación de dicha información en su proceso de aprendizaje.

## 4. CONCLUSIONES

Durante esta investigación se llevó a cabo una comprobación previa tanto de la técnica analítica a utilizar (espectrofotometría UV-vis) como del modelo matemático testado (perceptrón multicapa; PMC) dentro del campo de los aceites de oliva virgen extra (AOVEs), y a continuación, se validó la combinación de dicha técnica espectroscópica con los algoritmos no lineales en distintas problemáticas dentro del sector olivícola. La mezcla de ambas herramientas dio lugar a un diseño de experimentos dividido en tres partes fundamentales: la detección de adulterantes en muestras de AOVE, la clasificación de AOVEs monovarietales y la degradación del AOVE. La información extraída de todos los espectros de absorción de los distintos aceites estudiados fue utilizada para el diseño de los correspondientes PMC. En esta sección se expondrán las conclusiones a las que se ha llegado tras los resultados obtenidos en los estudios realizados durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

### 1. Pruebas previas

- La espectrofotometría de UV-vis es una técnica útil para la generación de datos relevantes en la identificación de adulterantes en un aceite monovarietal.
- Los perceptrones multicapa dan mejores resultados que los modelos clásicos lineales en el tratamiento de la información espectroscópica obtenida de las muestras de aceites analizadas.
- La combinación entre las redes neuronales artificiales testadas y la información espectroscópica es una herramienta adecuada para extraer la información de las muestras de AOVE para su caracterización.

### 2. Detección de adulterantes

- Los PMC pueden identificar distintos AOVE monovarietales y estimar el porcentaje en volumen de aceite de oliva refinado dentro de dichos aceites. La tasa de identificación fue del 100% para las cuatro variedades de AOVE testadas y el error en la estimación de la concentración de adulterante fue del 2,14% (apartado 3.3.1).
- Los PMC son capaces de cuantificar concentraciones de aceites de soja y almendra en mezclas binarias y ternarias con AOVE, con porcentajes de error absoluto medio inferiores al 3%. Los datos utilizados para ambos experimentos fueron las ABCs de los espectros de UV-vis de las mezclas analizadas (apartado 3.3.2).

### 3. Clasificación de AOVE monovarietales

- Estos modelos matemáticos también han logrado clasificar los AOVE monovarietales contenidos en mezclas tanto binarias como ternarias de tres aceites distintos, utilizando para ello los espectros UV-visible de las mezclas. Los errores de estimación de las cantidades de cada aceite dentro de las muestras fueron en ambas validaciones (usando 4 ABC como variables independientes) inferiores al 2.5% (apartado 3.3.3).
- Todas las bandas de los espectros de UV-vis contienen información relevante de los pigmentos del AOVE, ya que la utilización de cuatro ABC como variables dependientes da mejores resultados que el uso de únicamente dos.

### 4. Degradación del AOVE

- Este método ha logrado distinguir las condiciones de temperatura a las cuales han estado expuestas las muestras con una tasa de identificación del 100% y a la vez de predecir el tiempo durante el cual han sufrido dichas condiciones con un error máximo de 6,05 días, equivalentes al 6,87% del periodo de tiempo estudiado (apartado 3.3.4.1).
- Tanto la exposición del AOVE a bajas temperaturas fría (3°C) como a altas (40°C) aceleran su degradación con respecto a la temperatura ambiente (22 - 23°C).
- De las tres temperaturas estudiadas, la de 40°C es con la que más se degradaron los aceites durante los 88 días que se mantuvieron a dichas condiciones.
- La información espectroscópica combinada con el modelo no lineal empleado en toda esta investigación, puede prever los días que una muestra de AOVE ha estado expuesta a la luz solar indirecta, con un error de estimación del 5.3%. Esto se puede conseguir gracias a la fotodegradación de los pigmentos de este alimento (apartado 3.3.4.2).
- La intensidad de las bandas del espectro UV-vis de los AOVE disminuye con el tiempo como resultado de la degradación de las clorofilas y los carotenos presentes.

Con los distintos experimentos que se llevaron a cabo durante este trabajo, se puede concluir que el perceptrón multicapa es una herramienta matemática capaz de convertir datos espectroscópicos en señales características de adulteración o degradación. Además, la espectrofotometría de UV-vis es una técnica analítica rápida, sencilla y económica, cuando se compara con otras como RMN, espectrometría de masas o HPLC, que aparte de ser mucho más laboriosas, necesitan un pretratamiento de la muestra y los equipos son de mayor complejidad,

requieren de un mayor mantenimiento y presentan un coste mayor. Aunque estas técnicas aportan una mayor información sobre las muestras analizadas, el propósito de este trabajo fue el de crear una herramienta, rápida, barata y eficaz para el control de calidad de los aceites de oliva virgen extra. A lo largo de la realización de esta Tesis, se ha comprobado que con un tratamiento matemático no lineal basado en el perceptrón multicapa es posible obtener resultados comparables a los de otras técnicas mucho más caras, simplemente con información espectroscópica. Con este trabajo se abren nuevas puertas, sobre todo dentro del sector olivícola, pero seguramente ampliable a otros alimentos, con el fin de facilitar el control de tanto los procesos de producción como de almacenamiento y transporte de los productos desde las fábricas hasta los puntos de venta, para proteger la reputación de alimentos tan valiosos como el AOVE y también la economía de los principales productores. Por último, se daría un paso al frente para asegurar tanto los derechos del consumidor como su salud, al presentar herramientas para luchar contra el fraude alimentario y mantener un control sobre la degradación de los alimentos.



## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Ahlbom A, Bridges J, De Jong W, Hartemann P, Jung T, Mattsson MO, Pagès JM, Rydzynski K, Stahl D, Thomsen M. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, Light Sensitivity. *Scientific Rationale*. **2008**; 3.
- Alamprese C, Casale, Sinelli N, Lanteri S, Casiraghi E. Detection of minced boof adulteration with Turkey meat by UV-vis, NIR and MIR spectroscopy. *Lebensmittel-Wissenschaft und – Technologie- Food Science and Technology*. **2013**; 53: 225-32.
- Alkan D, Tokatli F, Ozen B. Phenolic characterization and gographical classification of commercial extra virgin olive oils produced in Turkey. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **2011**; 89(2): 261-8.
- Anniva C, Grigoriadou D, Psomiadou E, Tsimidou MZ. Pheophytin adegradation products as useful indices in the quality control of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2006**; 83: 371-5.
- Aparicio R, Morales MT, Alonso MV. Relationship between volatile compounds and sensory attributes of olive oils by the sensory Wheel. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **1996**; 73: 1253-64.
- Aparicio-Ruiz R y Harwood J (Eds.). *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*. Springer Science+Business Media New York. **2013**.
- Aparicio-Ruiz R, Mínguez-Mosquera MI, Gandul-Rojas B. Thermal degradation kinetics of chlorophyll pigments in virgin olive oils.1. Compuonds of series a. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**; 58: 6200-8.
- Aparicio-Ruiz R, Mínguez-Mosquera MI, Gandul-Rojas B. Thermal degradation kinetics of lutein,  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin in virgin olive oils. *Journal of food composition and analysis*. **2011**; 24: 811-20.
- Aroca-Santos R, Cancilla JC, Matute G, Torrecilla JS. Identifying and quantifying adulterants in extra virgin olive oil of the Picual varietal by absorption spectroscopy and nonlinear modelling. *J Agric Food Chem*. **2015**; 63:5646-52.
- Aroca-Santos R, Cancilla JC, Pariente ES, Torrecilla JS. Neural networks applied to characterize blends containing refined and extra virgin olive oils. *Talanta*. **2016-a**; 161:304-8.
- Aroca-Santos R, Cancilla JC, Pérez-Pérez A, Moral A, Torrecilla JS. Quantifying binary and ternary mixtures of monovarietal extra virgin olive oils with UV-vis absorption and chemometrics. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **2016-b**; 234: 115-21.
- Aroca-Santos R, Lastra M, Cancilla JC, Torrecilla JS. Linear and non-linear quantification of extra virgin olive oil, soybean oil, and sweet almond oil in blends to assess their commercial labels. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2018-a**. (en prensa).
- Aroca-Santos R, Lastra M, Cancilla JC, Torrecilla JS. Intelligent modelling to monitor the evolution of quality of extra virgin olive oil in simulated distribution conditions. *Biosystems Engineering*. **2018-b**; 172: 49-56.
- Arslan D y Özcan MM. Phenolic profile and antioxidant activity of olive fruits of the Turkish variety 'Sariulak' from different locations. *Grasas Aceites*. **2011**; 62: 453–461.
- Ayuso J, Haro MR, Escolar D. Simulation of the visible spectra for edible virgin olive oils: Potential uses. *Applied Spectroscopy*. **2004**; 58: 474-80.
- Baccioni L, Peri C. Centrifugal separation. *Extra-Virgin olive oil handbook*. Ed. John Wiley and sons. **2014**; capítulo 13: 139-154.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bajoub A, Medina-Rodríguez S, Gómez-Romero M, Ajal EA, Bagur-González MG, Fernández-Gutiérrez A, Carrasco-Pancorbo A. Assessing the varietal origin of extra-virgin olive oil using liquid chromatography fingerprints of phenolic compound, data fusion and chemometrics. *Food Chemistry*. **2017**; 215: 245-55.
- Barranco D, Fernández-Escobar R, Rallo L. *El cultivo del olivo*. 7ª edición. Ed Mundi-Prensa, **2017**. 1008 p.
- Beale MH, Hagan MT, Demuth HB. Neural Network Toolbox. User's Guide. Version 11.1. MATLAB. USA. **R2018a**. 558 p.
- Biancolillo A, Bucci R, Magri AL, et al. Data-fusion for multiplatform characterization of an italian craft beer aimed at its authentication. *Analytica Chimica Acta*. **2014**; 820: 23-31.
- Boggia R, Casolino MC, Hysenaj V, Oliveri P, Zunin P. A screening method based on UV-Visible spectroscopy and multivariate analysis to assess addition of filler juices and water to pomegranate juices. *Food Chemistry*. **2013**; 140: 735-41.
- Boselli E, Di-Lecce G, Strabbioli R, Pieralisi G, Frega NG. Are virgin olive oils obtained below 27°C better than those produced at higher temperatures? *LWT - Food Science and Technology*. **2009**; 42: 748-57.
- Boskou D. *History of Olives, Olive Oil, Chemistry and Technology*. AOCS Press, Champaign, Illinois U.S.A. **1996**.
- Bubola KB, Lukic M, Mofardin I, Butumovic A, Koprivnjak O. Filtered vs. naturally sedimented and decanted virgin olive oil during storage: Effect on quality and composition. *LWT*. **2017**; 84:370-7.
- Callao MP, Ruisánchez I. An overview of multivariate qualitative methods for food fraud detection. *Food Control*. **2018**; 86: 283-93.
- Cancilla JC, Torrecilla JS, Matute G. Current applications of artificial neural networks in biochemistry with emphasis on cancer research. *Curr Biochem Eng*. **2014-a**; 1(1): 25-34.
- Cancilla JC, Wang SC, Díaz-Rodríguez P, Matute G, Cancilla JD, Flynn D, Torrecilla JS. Linking Chemical Parameters to Sensory Panel Results through Neural Networks To Distinguish Olive Oil Quality. *J. Agric. Food Chem*. **2014-b**, 62, 10661-5.
- Carreras-Monfort C, Martin-Menendez A, Pera-Isern J, et al. Brindisi Amphorae in the Hispania Citerior Province. Patterns of Distribution and Consumption. *Sagvntvm-Papeles del Laboratorio de Arqueología de Valencia*. **2016**; Volumen 48: 103-21.
- Cavallo C, Caracciolo F, Cicia G, Del Giudice T. Extra-virgin olive oil: are consumers provided with the sensory quality they want? A hedonic price model with sensory attributes. *J. Sci. Food Agric*. **2018**; 98: 1591-8.
- Chen CY, Lapsley K y Blumberg J. A nutrition and health perspective on almonds. *J Sci Food Agric*. **2006**; 86 (14): 2245-50.
- CODEX STAN 33-1981. Disponible en: <http://www.codexalimentarius.org>.
- Consejo Oleícola Internacional, COI. **2018**. Disponible en: <http://www.internationaloliveoil.org>.
- Corominas-Faja B, Cuyàs E, Lozano-Sánchez J, Cufí S, Verdura S, Fernández-Arroyo S, Borrás-Linares I, Martín-Castillo B, Martín ÁG, Lupu R, Nonell-Canals A, Sanchez-Martinez M, Micó V, Joven J, Segura-Carretero A, Menendez JA. Extra-virgin olive oil contains a metabolo-epigenetic inhibitor of cancer stem cells. *Carcinogenesis*. **2018**; 39(4): 601–613.
- Covas MI, Nyssönen K, Poulsen HE, Kaikkonen J, Zunft HJF, Kiesewetter H, Gaddi A, de la Torre R., Mursu J, Bäumlér H, Nascetti S, Salonen JT, Fitó M, Virtanen J y Marrugat J. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*. **2006**; 145(5), 333-341.

- De la Puerta R, Martínez-Domínguez E, Ruíz-Gutiérrez V. Effect of Minor Components of Virgin Olive Oil on Topical Antiinflammatory Assays. *Naturforsch.* **2000**; 55c: 814-9.
- Demuth H, Beale M, Hagan M. Neural Network Toolbox for Use with MATLAB® User's Guide. Version 5. Ninth printing Revised for Version 5.1 (Release 2007b). **2007**.
- Dias C, Mendes L. Protected Designation of Origin (PDO), Protected Geographical Indication (PGI) and Traditional Speciality Guaranteed (TSG): A bibliometric analysis. *Food Research International.* **2018**; 103: 492-508.
- Díaz-Rodríguez, P.; Cancilla, J. C.; Wierchoś, K.; Torrecilla, J. S. Non-linear models applied to experimental spectroscopical quantitative analysis of aqueous ternary mixtures of imidazolium and pyridinium-based ionic liquids. *Sensors and Actuators B.* **2015**, 206, 139-45.
- Esteki M, Shahsavari Z, Simal-Gandara J. Use of spectroscopic methods in combination with linear discriminant analysis for authentication of food products. *Food Control.* **2018**; 91: 100-12.
- Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Aros F. et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *New England Journal of Medicine.* **2013**; 368: 1279-90.
- Figueiredo-González M, Reboredo-Rodríguez P, González-Barreiro C, Simal-Gándara J, Valentão P, Carrasco-Pancorbo A, Andrade PB, Cancho-Grande B. Evaluation of the neuroprotective and antidiabetic potential of phenol-rich extracts from virgin olive oils by in vitro assays. *Food Res Int.* **2018**; 106:558-567.
- Food and Drink Federation, FDF. **2018**. Disponible en: [http://www.fdf.org.uk/corporate\\_pubs/Food-Authenticity-guide-2014](http://www.fdf.org.uk/corporate_pubs/Food-Authenticity-guide-2014).
- Food Standards Agency, FSA. **2018**. Disponible en: <http://www.food.gov.uk/enforcement/foodfraud>.
- Forina M, Oliveri P, Bagnasco I, et al. Artificial nose, NIR and UV-visible spectroscopy for the characterisation of the PDO Chianti Classico olive oil. *Talanta.* **2015**; 144: 1070-8.
- Gandul-Rojas B, Roca M, Gallardo-Guerrero L. Chlorophylls and carotenoids in food products from olive tree. *Products from Olive Tree*. 1ª edición. Borkou D, Clodoveo ML. Ed: InTech, Rijeka, Croatia. **2016**; Capítulo 5: 67-98.
- Garrido-Delgado R, Muñoz-Pérez ME, Arce L. Detection of adulteration in extra virgin olive oils by using UV-IMS and chemometric analysis. *Food Control.* **2018**; 85:292-9.
- Genovese A, Rispoli T, Sacchi R. Extra virgin olive oil aroma release after interaction with human saliva from individuals with different body mass index. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* **2018**; 98 (9): 3376-83.
- Giuffrida D, Salvo F, Salvo A, Cossignani L, Dugo G. Pigments profile in monovarietal virgin olive oils from various Italian olive varieties. *Food Chem.* **2011**; 124: 1119-23.
- Gumus ZP, Ertas H, Yasar E, Gumus O. Classification of olive oils using chromatography, principal component analysis and artificial neural network modelling. *Journal of Food Measurement and Characterization.* **2018**; 12: 1325-33.
- Harris D. Light Spectroscopy. *BIOS Scientific Publishers Ltd.* Oxford. **1996**. 182 p.
- Hermoso M, Uceda M, García A, Morales B, Frias ML, Fernández A. *Elaboración de Aceite de Calidad*. Sevilla: Consejería de Agricultura y Pesca. **1991**.
- Jabeur H, Drira M, Rebai A y Bouaziz M. Putative markers of adulteration of higher-grade olive oil with less expensive pomace olive oil identified by gas chromatography combined with chemometrics. *J Agric Food Chem.* **2017**; 65 (26): 5375-83.



- Jabeur H, Zribi A, Abdelhedi, R, Bouaziz M. Effect of olive storage conditions on Chemlali live oil quality and the effective role of fatty acids alkyl esters in checking olive oils authenticity. *Food Chemistry*. **2015**; 169: 289-96.
- Jolayemi OS, Tokatli F, Ozen B. Effects of malaxation temperature and harvest time on the chemical characteristics of olive oils. *Food Chemistry*. **2016**; 211:776-83.
- Köseoğlu O, Sevim D, Kadiroğlu P. Quality characteristics and antioxidant properties of Turkish monovarietal olive oils regarding stages of olive ripening. *Food Chemistry*. **2016**; 212:628–34.
- Kosma I, Vavoura M, Kontakos S, Karabagias I, Kontominas M, Apostolos K, Badeka A. Characterization and classification of extra virgin olive oil from five less well-known greek olive cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. **2016**; 93(6): 937-48.
- Lazzerini C, Cifelli M, Domenici V. Extra virgin olive oils pigments: Authenticity and quality. *Products from Olive Tree*, 1ª edición. Borkou D, Clodoveo ML. Ed: InTech, Rijeka, Croatia. **2016**; Capítulo 6: 95-114.
- Lazzerini C, Cifelli M, Domenici V. Pigments in extra virgin olive oils produced in different mediterranean countries in 2014: Near UV-vis spectroscopy versus HPLC-DAD. *LWT - Food Science and Technology*. **2017**; 84:586-94.
- Leal-González L, Sampedro-Santos S. Hallazgos radiológicos en el sistema osteoarticular de enfermos del síndrome del aceite tóxico [Radiological findings in the osteoarticular system in toxic oil syndrome patients]. *Rehabilitación*. **1984**; 18: 551 -560.
- Liu W, Liu C, Yu J, Zhang Y, Li J, Chen Y, Zheng L. Discrimination of geographical origin of extra virgin olive oils using terahertz spectroscopy combined with chemometrics. *Food Chemistry*. **2018**; 251:86-92.
- Longobardi F, Ventrella A, Casiello G, Sacco D, Tasioula-Margari M, Kiritsakis AK, Kontominas mG. Characterisation of the geographical origin of Western Greek virgin olive oils based on instrumental and multivariate statistical analysis. *Food Chemistry*. **2012**; 133(1): 169-75.
- Lukić I, Žanetić M, Jukić Špika M, Lukić M, Koprivnjak O, Brkić Bubola K. Complex interactive effects of ripening degree, malaxation duration and temperature on Oblica cv. virgin olive oil phenols, volatiles and sensory quality. *Food Chemistry*. **2017**; 232:610-620.
- Malheiro R, Casal S, Rodrigues N, Renard CMGC, Pereira JA. Volatile changes in cv.Verdeal Transmontana olive oil: From the drupe to the table, including storage. *Food Research International*. **2018**; 106:374-82.
- Mapelli-Brahm P, Hernanz-Vila D, Stinco CM, Heredia FJ, Meléndez-Martínez AJ. Isoprenoids composition and colour to differentiate virgin olive oils from a specific mil. *LWT - Food Science and Technology*. **2018**; 89: 18-23.
- Mariani C, Lucci P y Conte L. Identification of phytol vaccinate as a major component of wax ester fraction of extra virgin olive oil. *Eur J Lipid Sci Technol*. **2018**; 120.
- Martínez-Huélamo M, Rodríguez-Morató J, Boronat A, De la Torre R. Modulation of Nrf2 by Olive Oil and Wine Polyphenols and Neuroprotection. *Antioxidants*. **2017**; 6 (73).
- McCulloch WS, Pitts W. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *Bull Math Biophys*. **1943**; 5 (4):115-133.
- Menéndez JA, Vázquez-Martín A, Colomer R, Brunet J, Carrasco-Pancorbo A, Garcia-Villalba R, Fernández-Gutiérrez A, Segura-Carretero A. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer* **2007**; 7:80–98.
- Messeguer A. Potential implication of aniline derivatives in the Toxic Oil Syndrome (TOS). *Chem Biol Interact*. **2011**; 192(1-2):136-41.

- Mínguez-Mosquera MI, Rejavo-Navarro L, Gandul-Rojas B, Sanchez-Gomez AH, Garrido-Fernandez J. Color-Pigment Correlation in Virgin Olive Oil. *J. A. Oil Chem. Soc.* **1991**; 68: 332-6.
- Montaño AM. Medida de diferentes parámetros físico-químicos de aceitunas y aceites vírgenes de las variedades principales cultivadas en Extremadura y desarrollo de técnicas elaioténicas para la mejora de la comerciabilidad de los Aceites de Oliva Vírgenes. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura (España). **2016**. 654 p.
- Nedic V, Despotovic D, Cvetanovic S, Despotovic M, Babic S. Comparison of classical statistical methods and artificial neural network in traffic noise prediction. *J. Environment Impact Assessment Review*. **2014**; 49: 24-30.
- Nocella C, Cammisotto V, Fianchini L, D'Amico A, Novo M, Castellani V, Stefanini L, Violi F, Carnevale R. Extra Virgin Olive Oil and Cardiovascular Diseases: Benefits for Human Health. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*. **2018**; 18: 4-13.
- Olsen ED. Métodos ópticos de análisis. Editorial Reverté S.A. Málaga, España. **2010**. 535 p.
- Oroian M, Ropciuc S, Paduret S. Honey adulteration detection using Raman Spectroscopy. *Food Anal Methods*. **2018**; 11:959–968.
- Parkinson L, Cicerale S. The Health Benefiting Mechanisms of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds. *Molecules*. **2016**; 21 (12): 1734.
- Polari JJ, Garcí-Aguirre D, Olmo-García L, Carrasco-Pancorbo A, Wang SC, Impact of industrial hammer mill rotor speed on extraction efficiency and quality of extra virgin olive oil. *Food Chemistry*. **2018**; 242:362-368.
- Psomiadou E, Tsimidou M. Stability of virgin olive oil. 2. Photooxidation studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002-a**; 50: 722-7.
- Psomiadou E, Tsimidou M. Stability of virgin olive oil. Autoxidation studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002-b**; 50: 716-21.
- Qian J, Xing B, Wu X, Chen M, Wang Y. A smartphone-based apple yield estimation application using imaging features and the ANN method in mature period. *Scientia Agricola*. **2018**; 75 (4): 273-80.
- Ramprasath VR, Awad AB. Role of Phytosterols in Cancer Prevention and Treatment. *Journal of AOAC International*. **2015**; 98 (3): 735-8.
- Rezzi S, Axelson DE, Héberger K, Reniero F, Mariani C, Guillou C. Classification of olive oils using high throughput flow 1H NMR fingerprinting with principal component analysis, linear discriminant analysis and probabilistic neural networks. *Analytica Chimica Acta*. **2005**; 552 (1-2): 13-24.
- Ríos Castro A, Moreno Bondi MC, Simonet Suau BM (coords.). Técnicas espectroscópicas en química analítica. Volumen I. Aspectos básicos y espectrometría molecular. Ed. Síntesis. Madrid, España. **2012**. 460 p.
- Rodríguez-Morató J, Xicota L, Fitó M, íFarré M, Dierssen M y De la Torre R. Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules*. **2015**; 20: 4655-80.
- Rohman, A.; Che Man, Y. B.; Yusof, F. M. The Use of FTIR Spectroscopy and Chemometrics for Rapid Authentication of Extra Virgin Olive Oil. *J Am Oil Chem Soc*. **2014**, 91, 207-13.
- Salas J, Harwood J, Martínez E. Lipid metabolism in olive: Biosynthesis of triacylglycerols and aroma components. *Handbook of olive oil: Analysis and properties*. R. Aparicio, J. Harwood. Ed: New York: Springer Science+Business Media. **2013**; 97-127.

- Sayago A, Marin MI, Aparicio R, et al. Vitamin E and vegetable oils. *Grasas y Aceites*. **2007**; 58 (1): 74-86.
- Sen I, Tokatli F. Differentiation of wines with the use of combined data of UV-visible spectra and color characteristics. *Journal of Food Composition and Analysis*. **2016**; 45:101-7.
- Serious Fraud Office, SFO. **2018**. Disponible en: <http://www.sfo.gov.uk/fraud>.
- Servili M, Sordini B, Esposto S, Urbani S, Veneziani G, Di Maio I, Taticchi A. Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. *Antioxidants*. **2014**; 3: 1-23.
- Shehada N, Cancilla JC, Torrecilla JS, Pariente ES, Brönstrup G, Christiansen S, Johnson DW, Leja M, Davies MPA, Liran O, Peled N, Haick H. Silicon nanowire sensors enable diagnosis of patients via exhaled breath. *ACS Nano*. **2016**; 10 (7):7047–57.
- Siddiqui AJ, Musharraf SG, Choudhary MI. Application of analytical methods in authentication and adulteration of honey. *Food Chemistry*. **2017**; 217: 687-98.
- Silva SF, Anjos CA, Cavalcanti RN, Celeghini RM. Evaluation of extra virgin olive oil stability by artificial neural network. *Food chemistry*. **2015**; 179: 35-43.
- Simcox PD, Garland W, Deluca V, Canvin DI y Dennis DT. Respiratory pathways and fat synthesis in the developing castor oil seeds. *Canadian Journal of Botany*. **1979**; 57: 1008-14.
- Skoog DA, West DM, James Holler F, Crouch SR. Espectrometría de absorción molecular. *Fundamentos de Química Analítica*. 8ª edición. Ed. Thomson, España. **2005**; capítulo 26: 794-835.
- Skoog DA, West DM, James Holler F, Crouch SR. Instrumentos de espectrometría óptica. *Fundamentos de Química Analítica*. 8ª edición. Ed. Thomson, España. **2005**; capítulo 25: 753-93.
- Skoog DA, West DM, James Holler F, Crouch SR. Introducción a los métodos espectroquímicos. *Fundamentos de Química Analítica*. 8ª edición. Ed. Thomson, España. **2005**; capítulo 24: 719-52.
- Solis-Herruzo JA, Colina F, Castellano G, Muñoz-Yagüe MT, Morillas JD. Clinico-biochemical evolution and late hepatic lesions in the toxic oil síndrome. *Gastroenterol*. **1987**; 93(3):558 – 568.
- Stark AH y Madar Z. Olive oil as a functional food: epidemiology and nutritional approaches. *Nutr Rev*. **2002**; 60 (6): 170-6.
- Tekaya M, Mechri B, Cheheb H, Attia F, Chraief I, Ayachi M, Boujneh D y Hammami M. Changes in the profiles of mineral elements, phenols, tocopherols and soluble carbohydrates of olive fruit following foliar nutrient fertilization. *LWT - Food Science and Technology*. **2014**; 59: 1047-1053.
- Thienes CP, Masiri J, Benoit LA, Barrios-Lopez B, Samuel SA, Cox DP, Dobritsa AP, Nadala C, Samadpour M. Quantitative Detection of Pork Contamination in Cooked Meat Products by ELISA. *J AOAC International*. **2018**; 101(3): 810-16.
- Torrecilla JS, Aroca-Santos R, Cancilla JC, Matute G. Algorithmic modeling of spectroscopic data to quantify binary mixtures of vinegars of different botanical origins. *Anal. Methods*. **2016-b**; 8: 1786-93.
- Torrecilla JS, Aroca-Santos R, Cancilla JC, Matute G. Linear and non linear modeling to identify vinegars in blends through spectroscopic data. *LWT-Food Science and Technology*. **2016-a**; 65: 565-71.
- Torrecilla JS, Cancilla JC, Matute G, Díaz-Rodríguez P, Flores AI. Self-organizing maps based on chaotic parameters to detect adulterations of extra virgin olive oil with inferior edible oils. *Journal of Food and Engineering*. **2013-a**, 118, 400-5.

- Torrecilla JS, Cancilla JC, Matute G, Díaz-Rodríguez P. Neural network models to classify olive oils within the protected denomination of origin framework. *International Journal of Food Science and Technology*, **2013-b**, 48, 2528-34.
- Torrecilla JS, Mena ML, Yáñez-Sedeño P, García J. Application of artificial neural network to the determination of phenolic compounds in olive oil mill wastewater. *Journal of Food Engineering*. **2007**, 81, 544-52.
- Torrecilla JS, Vidal S, Aroca-Santos R, Wang SC, Cancilla JC. Spectroscopic determination of the photodegradation of monovarietal extra virgin olive oils and their binary mixtures through intelligent systems. *Talanta*. **2015**; 144:363-8.
- Torrecilla JS. Secado del Orujo en lecho Fluidizado-Móvil. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid (España). **2000**. 231 p.
- Torrecilla JS. The Olive: Its Processing and Waste Management. **2010**. 133 p
- Tsopelas F, Konstantopoulos D, Kakoulidou AT. Voltammetric fingerprinting of oils and its combination with chemometrics for the detection of extra virgin olive oil adulteration. *Anal Chim Acta*. **2018**; 1015:8-19.
- U.S. Food and Drug Administration, FDA. **2018**. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/FoodDefense>.
- Uceda M y Frías L. Harvest Dates. Evolution of the Fruit Oil Content, Oil Composition and Oil Quality. *Proceeding of II Seminario Oleícola Internacional International Olive-Oil Council. Córdoba*. **1975**; 125-30.
- Ulloa PA, Guerra R, Cavaco AM, et al. Determination of the botanical origin of honey sensor fusión of impedance e-tongue and optical spectroscopy. *Computers and Electronics in Agriculture*. **2013**; 94: 1-11.
- Visioli F and Galli C. The effect of minor constituents of olive oil on cardiovascular disease: new findings. *Nutrition Rev*. **1998**; 56:142-47.
- Visioli F, Poli A, Galli C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal Research Reviews*. **2002**; 22: 65-75.
- Wiedemair V, De Biasio M, Leitner R, Balthasar D, Huck CW. Application of design of experiment for detection of meat fraud with a portable near-infrared spectrometer. *Current Analytical Chemistry*. **2018**; 14(1):58-67.
- Wierzchos K, Cancilla JC, Díaz-Rodríguez P, Torrecilla JS, Davila AF, Ascaso C, Nienow J, McKay CP and Wierzchos J. Application of artificial neural networks as a tool for moisture prediction in microbially colonized halite in the Atacama Desert. *JGR: Biogeosciences*. **2015**; 120(6):1018-26.
- Wongwarawipat T, Papageorgiou N, Bertsias D, et al. Olive oil-related Anti.inflammatory Effects on Atherosclerosis: Potential Clinical Implications. *Endocrine Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*. **2018**; 18 (1): 51-62.